



**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA**

**TESIS DOCTORAL**

**APLICACIONES ANALÍTICAS DE MÉTODOS BASADOS EN  
LUMINISCENCIA MOLECULAR EN COMBINACIÓN CON  
METODOLOGÍAS DINÁMICAS**

**Ana María Jiménez Girón  
Badajoz, 2007**

***Edita: Universidad de Extremadura  
Servicio de Publicaciones***

Caldereros 2. Planta 3<sup>a</sup>  
Cáceres 10071  
Correo e.: [publicac@unex.es](mailto:publicac@unex.es)  
<http://www.unex.es/publicaciones>

# **APLICACIONES ANALÍTICAS DE MÉTODOS BASADOS EN LUMINISCENCIA MOLECULAR EN COMBINACIÓN CON METODOLOGÍAS DINÁMICAS**

por

**Ana María Jiménez Girón**

VISADO en Badajoz a 10 de Abril de 2007

Fdo.- Dr. Arsenio Muñoz de la Peña Castrillo  
Catedrático del Departamento de Química Analítica  
de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Extremadura

Fdo.- Dra. Dña. Isabel Durán Martín-Merás  
Profesora Titular del Departamento de  
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 2003-2005, y realizada en el Departamento de Química Analítica de la Universidad de Extremadura.

Fdo.: Ana María Jiménez Girón



DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

Campus Universitario  
Avda. de Elvas, s/n  
06071-BADAJOS  
Teléfono 924 289 300/924 289 375  
FAX 924 289 375  
E-mail: quiana@unex.es

ARSENIO MUÑOZ DE LA PEÑA CASTRILLO, 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 "**APLICACIONES ANALÍTICAS DE MÉTODOS BASADOS EN LUMINISCENCIA MOLECULAR EN COMBINACIÓN CON METODOLOGÍAS DINÁMICAS**", ha sido realizado bajo la dirección del Dr. D. **Arsenio Muñoz de la Peña Castrillo** y la Dra. Dña. **Isabel Durán Martín-Merás**, 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 Químicas.

Badajoz, 10 de Abril de 2007



Me gustaría expresar mi agradecimiento a todas las personas que, de un modo u otro, me han ayudado para que la realización de esta tesis fuese posible o, al menos, más llevadera.

En primer lugar, quiero dar las gracias a mis directores de tesis, el Dr. Arsenio Muñoz de la Peña y la Dra. Isabel Durán Martín-Merás, por guiarme tan adecuadamente estos cuatro años, siendo para mí, no sólo excelentes maestros, sino magníficas personas.

A todos los profesores del Dpto. de Química Analítica, gracias por vuestro cariño y enseñanzas estos años. Me gustaría hacer una mención especial a la Dra. Anunciación Espinosa Mansilla, por su gran disponibilidad siempre que he necesitado su ayuda y al Dr. Francisco Salinas, que me abrió las puertas del departamento.

A Manolo Caro, por solucionarme todos los problemas informáticos y burocráticos con tanta eficacia y alegría.

A todos mis compañeros de laboratorio, a los que me acogieron y ayudaron cuando comencé (Flori, David, Diego B., Antonio, Belén, M<sup>a</sup> José, Manolo, Santos y Loles) y a los que han ido llegando (Diego A., Alicia, José Manuel, Prado y Nancy) formando parte de esta “familia” con la que he compartido tantas horas, risas y charlas.

Al Dr. J. A. Murillo, a la Dra. A. Alañón y demás miembros del Dpto. de Química Analítica y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Castilla la Mancha.

Al Dr. A. Olivieri, por haberme enseñado tantísimo en sólo tres meses y por haberme tratado como a una hija durante mi estancia en Rosario. También quisiera dar las gracias a la Dra. G. Escandar, Dra. P. Damiani y resto de miembros del Dpto. de Química Analítica de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la Universidad Nacional de Rosario. Y no puedo olvidarme de Ale, el mejor compañero de laboratorio y amigo.

Al Dr. H. Goicochea por aclararme cualquier duda siempre en tan poco tiempo.

A mis amigos Jesús y Ana, con los que he compartido la carrera y casi toda la tesis. Gracias por vuestra comprensión, vuestra ayuda y por haberme hecho más alegre cada día en la universidad. Muchas gracias también a Noelia por ser más que una compañera de piso, por entenderme tan bien y prestarme sus oídos tantas y tantas noches.

A mis amigas y mis hermanos, Luis e Isabel, por interesarse y preocuparse de cada paso que he ido dando, implicándose en esta tesis desde el principio.

A Lluís, por su constante alegría, su paciencia y su incansable esfuerzo para mostrarme siempre el lado bueno, por hacerme reír a pesar de mis agobios y sobre todo, muchas gracias por ayudarme a desconectar cuando me parecía imposible no pensar en otra cosa que no fuera la tesis.

Finalmente, quiero dar las gracias a mis padres, porque siempre me han apoyado y me han dado su confianza, por sus consejos, por su ayuda y por ser para mí el mayor ejemplo.

A todos, sinceramente, muchas gracias.



## **OBJETO DE LA TESIS DOCTORAL**

El objeto de esta Memoria de Investigación es el establecimiento de nuevos métodos de determinación analítica, utilizando como técnica de detección la luminiscencia molecular (fluorescencia y quimioluminiscencia), en combinación con metodologías dinámicas. Para ello, en todos los casos, se utilizará el tiempo como parámetro analítico, con objeto de aprovechar el comportamiento cinético, para proporcionar información relevante adicional de la especie de interés. Los compuestos a estudiar incluyen el pesticida organofosforado quinalfos, antibióticos de la familia de las fluoroquinolonas, norfloxacino, ofloxacino y ciprofloxacino, ácido fólico y metotrexato, ácido fólico y dos de sus metabolitos, ácido 5-metil tetrahidrofólico y ácido tetrahidrofólico y, finalmente, procaína y su metabolito ácido p-amino benzoico. Se pretende explorar, por primera vez, la utilización de quimioluminiscencia resuelta en el tiempo, en combinación con un método de calibración multivariante de primer orden. Se abordará el desarrollo de varios métodos de calibración multivariante de segundo orden, utilizando como señales analíticas matrices de datos de segundo orden, obtenidas registrando espectros de emisión de fluorescencia en función del tiempo. Finalmente, esta Memoria tiene como objeto la utilización de datos de tercer orden, obtenidos mediante el seguimiento cinético de matrices de excitación-emisión (EEMs). Con ello, se pretende abrir nuevas vías de utilización de datos de tercer orden, prácticamente inexplorados hasta ahora, proponiendo un nuevo algoritmo genuinamente multidimensional, N-PLS/RTL, que aporte la flexibilidad inherente a los métodos basados en mínimos cuadrados parciales, así como la ventaja de segundo orden a datos de cuatro vías.



## ÍNDICE



---

<b>PRESENTACIÓN DE CAPÍTULOS</b> .....	1
<b>APARATOS REACTIVOS Y PROGRAMAS INFORMÁTICOS</b> .....	7
<b>Capítulo I. DETERMINACIÓN CINÉTICO-FLUORIMÉTRICA DE QUINALFOS EN AGUAS NATURALES</b>	
<b>I.1. INTRODUCCIÓN</b> .....	17
I.1.1. Consideraciones generales sobre los pesticidas.....	17
I.1.2. Características generales del Quinalfos.....	24
I.1.3. Revisión Bibliográfica.....	28
I.1.4. Características generales de los métodos cinéticos de análisis.....	31
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	35
<b>I.2. DETERMINACIÓN CINÉTICA DE QUINALFOS EN MODO CLÁSICO</b> ..	37
I.2.1. Estudio espectrofluorimétrico de quinalfos.....	37
I.2.2. Procedimiento de trabajo. Optimización de las variables químicas..	40
I.2.3. Curvas de calibrado.....	58
I.2.4. Estudio de la precisión.....	65
I.2.5. Estudio de la selectividad del método propuesto.....	69
<b>I.3. DETERMINACIÓN CINÉTICA DE QUINALFOS EN MODO FLUJO DETENIDO</b> .....	71
I.3.1. Procedimiento de trabajo. Optimización de las variables químicas..	71
I.3.2. Curvas de calibrado.....	82
I.3.3. Estudio de la precisión.....	86
I.3.4. Estudio de la selectividad del método propuesto.....	90
<b>I.4. COMPARACIÓN DE MÉTODOS</b> .....	91
I.4.1. Velocidad máxima vs velocidad calculada en un intervalo de tiempo fijo.....	93
I.4.2. Modo clásico vs modo en flujo detenido.....	95
<b>I.5. APLICACIONES</b> .....	96
I.5.1. Extracción en fase sólida.....	96
I.5.2. Determinación de quinalfos en aguas.....	103

<b>I.6. CONCLUSIONES</b> .....	105
<b>I.7. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	107
<b>Capítulo II. MÉTODOS DE CALIBRACIÓN MULTIVARIANTE. FUNDAMENTOS TEÓRICOS</b>	
<b>II.1. INTRODUCCIÓN</b> .....	113
<b>II.2. CALIBRACIÓN MULTIVARIANTE</b> .....	113
II.2.1. Calibración multivariante de primer orden.....	118
II.2.1.1. <i>Análisis por componentes principales (PCA)</i> .....	120
II.2.1.2. <i>Mínimo cuadrados parciales (PLS)</i> .....	122
II.2.2. Calibración multivariante de segundo orden.....	130
II.2.2.1. <i>Mínimos cuadrados parciales concatenados (U-PLS)</i> .....	134
II.2.2.2. <i>Mínimos cuadrados parciales multidimensionales (N-PLS)</i> ...	135
II.2.2.3. <i>U-PLS y N-PLS acoplados a RBL</i> .....	137
II.2.2.4. <i>Análisis factorial paralelo (PARAFAC)</i> .....	142
II.2.2.5. <i>Aspectos relacionados con las características de PLS, N-PLS y PARAFAC</i> .....	146
II.2.2.6. <i>Descomposición trilineal alternada autoponderada (SWATLD)</i> .....	148
II.2.2.7. <i>Mínimo cuadrados bilineales</i> .....	149
II.2.3. Calibración multivariante de tercer orden.....	153
II.2.3.1. <i>PARAFAC</i> .....	157
II.2.3.2. <i>Mínimos cuadrados trilineales (TLLS)</i> .....	159
II.2.3.3. <i>N-PLS</i> .....	162
II.2.3.4. <i>U-PLS y N-PLS acoplados a RTL</i> .....	163
<b>II.3. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	166

---

<b>Capítulo III. DETERMINACIÓN DE FLUOQUINOLONAS EN FÁRMACOS MEDIANTE QUIMIOLUMINISCENCIA RESUELTA EN EL TIEMPO. RESOLUCIÓN DE MEZCLAS BINARIAS MEDIANTE MÍNIMOS CUADRADOS PARCIALES (PLS)</b>	
<b>III.1. INTRODUCCIÓN</b> .....	173
III.1.1. Características de las fluoroquinolonas.....	173
III.1.2. Características de Norfloxacin, Ofloxacin y Ciprofloxacino.....	179
III.1.3. Revisión Bibliográfica.....	180
III.1.4. Características generales de la Quimioluminiscencia.....	181
III.1.5. Fluoroquinolonas y Quimioluminiscencia.....	189
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	193
<b>III.2. ESTUDIOS QUIMIOLUMINISCENTES PREVIOS</b> .....	195
III.2.1. Montaje empleado.....	196
<b>III.3. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES QUÍMICAS Y PARÁMETROS INSTRUMENTALES</b> .....	198
III.3.1. Influencia de la concentración de ácido sulfúrico.....	198
III.3.2. Influencia de la concentración de Ce (IV).....	199
III.3.3. Influencia de la concentración de Ru(bipy) <sub>3</sub> <sup>2+</sup> .....	200
III.3.4. Influencia de la velocidad de flujo en la intensidad QL.....	202
<b>III.4. CURVAS DE CALIBRADO</b> .....	203
<b>III.5. ESTUDIO DE INTERFERENCIAS Y APLICACIONES</b> .....	207
<b>III.6. DETERMINACIÓN DE MEZCLAS BINARIAS DE FLUOROQUINOLONAS EN PROBLEMAS SINTÉTICOS MEDIANTE CALIBRACIÓN MULTIVARIANTE DE PRIMER ORDEN</b> .....	211
III.6.1. Matriz de calibración y conjunto de predicción.....	212
III.6.2. Optimización del modelo PLS y aplicaciones.....	213
<b>III.7. CONCLUSIONES</b> .....	218
<b>III.8. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	219

**Capítulo IV. DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE ÁCIDO FÓLICO Y METOTREXATO EN MUESTRAS BIOLÓGICAS**

<b>IV.1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>225</b>
IV.1.1. Características del Ácido Fólico.....	226
IV.1.2. Características del Metotrexato.....	230
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>235</b>
<b>IV.2. ESTUDIOS FLUORIMÉTRICOS PREVIOS.....</b>	<b>237</b>
IV.2.1. Optimización de las condiciones químicas y de los parámetros instrumentales.....	239
IV.2.2. Estudio de la linealidad.....	254
<b>IV.3. DETERMINACIÓN DE AF Y MTX EMPLEANDO DATOS DE PRIMER ORDEN.....</b>	<b>257</b>
<b>IV.4. DETERMINACIÓN DE AF Y MTX EMPLEANDO DATOS DE SEGUNDO ORDEN.....</b>	<b>265</b>
V.4.1. Matriz de calibración y validación del conjunto de predicción.....	267
<b>IV.5. DETERMINACIÓN DE AF Y MTX EMPLEANDO DATOS DE TERCER ORDEN.....</b>	<b>276</b>
IV.5.1. Determinación de AF y MTX en muestras de orina.....	288
<b>IV.6. EVALUACIÓN DE UNFOLDED-PLS ACOPLADO CON TRILINEALIZACIÓN RESIDUAL PARA LA RESOLUCIÓN DE LA MEZCLA BINARIA DE AF Y MTX EN MUESTRAS DE SUERO.....</b>	<b>293</b>
IV.6.1. Determinación de AF y MTX en muestras de suero.....	294
<b>IV.7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>301</b>
<b>IV.8. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>303</b>



---

<b>Capítulo V. DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE ÁCIDO FÓLICO Y SUS METABOLITOS, ÁCIDO 5-METIL TETRAHIDROFÓLICO Y ÁCIDO TETRAHIDROFÓLICO, EN SUERO</b>	
<b>V.1. INTRODUCCIÓN</b> .....	309
V.1.1. Características del AF y sus metabolitos THF y 5M.....	310
V.1.2. Fluorescencia inducida fotoquímicamente a temperatura ambiente..	311
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	321
<b>V.2. ESTUDIOS FLUORIMÉTRICOS PREVIOS</b> .....	323
V.2.1. Influencia de la radiación UV en la fluorescencia de AF, THF y 5M....	328
V.2.2. Influencia de la radiación UV en la fluorescencia de AF, THF y 5M, en presencia de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	335
<b>V.3. RESOLUCIÓN DE LA MEZCLA BINARIA DE AF Y 5M CON MÉTODOS DE CALIBRACIÓN MULTIVARIANTE DE SEGUNDO ORDEN</b> .....	338
V.3.1. Superficie de respuesta y diseño de experimentos. Fundamento teórico	340
V.3.2. Optimización de variables instrumentales.....	346
V.3.3. Optimización de las condiciones físico-químicas de las reacciones.....	355
V.3.4. Rectas de calibrado.....	358
V.3.5. Resolución de la mezcla binaria de AF y 5M empleando datos de segundo orden .....	360
V.3.6. Matriz de calibración y validación del conjunto de predicción.....	363
V.3.7. Determinación de AF y 5M en muestras de suero.....	377
<b>V.4. RESOLUCIÓN DE LA MEZCLA TERNARIA DE AF, 5M Y THF CON MÉTODOS DE CALIBRACIÓN MULTIVARIANTE DE SEGUNDO Y TERCER ORDEN</b> .....	385
V.4.1. Resolución de la mezcla ternaria de AF, 5M y THF empleando datos de segundo orden.....	389
V.4.2. Resolución de la mezcla ternaria de AF, 5M y THF empleando datos de tercer orden.....	393
V.4.3. Determinación de AF, THF y 5M en muestras de suero.....	400
<b>V.5. CONCLUSIONES</b> .....	405
<b>V.6. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	407

**Capítulo VI. N-PLS ACOPLADO A RTL: UNA NUEVA HERRAMIENTA MULTIDIMENSIONAL PARA EL ESTUDIO DE DATOS DE TERCER ORDEN. ANÁLISIS SIMULTÁNEO DE PROCAÍNA Y SU METABOLITO, ÁCIDO *p*-AMINO BENZOICO EN SUERO EQUINO**

<b>VI.1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>413</b>
<b>VI.2. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS ANESTÉSICOS LOCALES.....</b>	<b>415</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>421</b>
<b>VI.3. ESTUDIOS FLUORIMÉTRICOS Y CINÉTICOS.....</b>	<b>423</b>
VI.3.1. Optimización de las condiciones químicas y parámetros instrumentales.....	425
VI.3.2. Estudio de la linealidad y aditividad de las señales.....	429
<b>VI.4. DETERMINACIÓN DE PROCAÍNA Y ÁCIDO <i>p</i>-AMINO BENZOICO EMPLEANDO DATOS DE TERCER ORDEN.....</b>	<b>431</b>
VI.4.1. Conjunto de calibración y validación.....	434
VI.4.2. Determinación de PROCA y PABA en suero equino.....	443
<b>VI.5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>456</b>
<b>VI.6. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>457</b>
<b>TRABAJOS PUBLICADOS Y ENVIADOS.....</b>	<b>461</b>

## **PRESENTACIÓN DE CAPÍTULO**



A lo largo de esta Memoria se han desarrollado una serie de métodos de determinación analítica de diversos compuestos. La técnica de trabajo utilizada en todos los métodos analíticos es la luminiscencia molecular (fluorescencia y quimioluminiscencia) en combinación con metodologías dinámicas. Los métodos se han aplicado a muestras acuosas, fármacos y muestras biológicas (orina y suero). Se han utilizado distintas estrategias instrumentales (análisis en flujo, fluorescencia fotoinducida) y quimiométricas (métodos de calibración multivariante) para el establecimiento de los métodos de análisis. Entre estos últimos podemos citar métodos de primer orden (PLS), segundo orden (PARAFAC, SWATLD, BLLS/RBL, U-PLS/RBL, N-PLS/RBL) y tercer orden (PARAFAC, TLLS/RTL, U-PLS/RTL y N-PLS/RTL).

En el **Capítulo I** se han desarrollado dos métodos cinéticos para la determinación de Quinalfos, insecticida organofosforado que se utiliza contra una gran variedad de plagas en verduras, frutales, etc. Para ello, se trabaja de dos modos, mezclando manualmente los reactivos en la cubeta de medida del espectrofluorímetro y, utilizando el reactor de flujo parado, Milliflow, para poder controlar y reproducir el instante en el que se produce la mezcla de los reactivos. Además, se ha optimizado un proceso previo de extracción en fase sólida con objeto de determinar Quinalfos en diversas muestras de agua.

En el **Capítulo II** se desarrollan los fundamentos teóricos de las distintas metodologías de calibración multivariante de primer, segundo y tercer orden que se emplean a lo largo de esta Memoria, poniendo de manifiesto las ventajas y desventajas de cada una de ellas, así como sus aplicaciones más adecuadas. Entre ellas, se desarrolla el método multivariante N-PLS/RTL. Dicho método supone un avance importante dentro de los métodos quimiométricos de calibración multivariante, siendo una buena alternativa, para datos de cuatro vías, en aquellos casos en que no se cumpla estrictamente la linealidad de los datos en todas las dimensiones.

En el **Capítulo III** se estudian tres antibióticos pertenecientes a la familia de las fluoroquinolonas. Se desarrolla un método para la determinación de norfloxacin, ciprofloxacino y ofloxacino, en formulaciones farmacéuticas, utilizando como señal analítica

la quimioluminiscencia resuelta en el tiempo, utilizando un sistema de análisis en flujo detenido. En la introducción del capítulo se hace referencia a las características generales de la quimioluminiscencia. Finalmente, se emplea, por primera vez, la quimioluminiscencia resuelta en el tiempo, en combinación con un método de calibración multivariante de primer orden, PLS-1, para resolver mezclas binarias de las fluoroquinolonas.

En el **Capítulo IV** se estudian dos principios activos, ácido fólico, que actúa como precursor en la síntesis de DNA, y metotrexato, perteneciente al grupo de los antifolatos, con actividad quimioterápica en los tratamientos antineoplásicos. Estos compuestos, débilmente fluorescentes, se determinan a partir de los productos formados como consecuencia del proceso de oxidación que sufren en presencia de permanganato potásico y, para ello, se emplean datos de primer, segundo y tercer orden. Empleando datos de tercer orden, es posible la determinación de estos analitos en orina y, mediante el método U-PLS/RTL, es posible su determinación en una matriz aún más compleja, como es el suero, comprobando la mayor capacidad predictiva de este algoritmo, para este problema en concreto, frente a PARAFAC, método más frecuentemente utilizado para datos de segundo orden.

En el **Capítulo V** se estudia la mezcla binaria de ácido fólico y su metabolito, ácido 5-metil tetrahidrofólico, así como la mezcla ternaria de los anteriores y ácido tetrahidrofólico. Se hace uso de nuevo de técnicas quimiométricas multivariantes, tanto de segundo como de tercer orden y se combinan con Fluorescencia Inducida Fotoquímicamente, cuya teoría se desarrolla en la introducción del presente capítulo. Con objeto de automatizar la toma de datos, diseñamos un sistema de irradiación en continuo que nos permite realizar el registro de datos de tres y cuatro vías, con el tiempo de irradiación. Los métodos de tercer orden aplicados nos permiten realizar la determinación simultánea de estos tres analitos en suero, con recuperaciones satisfactorias en todos los casos.

En el **Capítulo VI** los analitos objetos de estudio son el anestésico local procaína y su metabolito ácido *p*-amino benzoico. En la introducción del capítulo se describen las características de los anestésicos locales. En este capítulo se aplica un nuevo método multivariante de tercer orden, N-PLS/RTL, que presenta la ventaja de segundo orden y

demuestra ser una buena alternativa frente a PARAFAC, que requiere la multilinealidad de los datos y es incapaz de resolver adecuadamente el problema planteado sin emplear restricciones e inicialización. Los datos de cuatro vías que emplearemos serán la evolución cinética de las matrices de excitación-emisión. Se propone un método para la determinación simultánea de los analitos en muestras de suero equino.





**APARATOS, REACTIVOS Y PROGRAMAS INFORMÁTICOS**



## APARATOS

- Espectrómetro de luminiscencia SLM Aminco Bowman Series 2, equipado con una lámpara continua de Xenón de 150 W para las medidas de fluorescencia y, una lámpara pulsante de Xenón de 7 W, para medidas de fosforescencia. El espectrómetro de luminiscencia está controlado por ordenador mediante el programa AB2, versión 5.0., bajo el sistema operativo Windows 98.
- Espectrofluorímetro Varian, modelo Cary Eclipse, equipado con una lámpara de Xenón. La adquisición de datos se realizó mediante el software The Cary Eclipse, versión 1.0. El fluorímetro está acoplado a un ordenador mediante una tarjeta GPIB (IEE-488).
- Detector CL-2 Camspec Chemiluminescence, que consta de un módulo Hamamatsu 45773-20 con respuesta espectral de 300 a 600 nm, célula de flujo en espiral con capacidad de 120  $\mu$ L y controlado por ordenador mediante el programa CSW32 (Chromatography Station for Windows).
- Espectrofotómetro UV-Visible Varian, modelo Cary 50 Bio con lámpara de Xenon, ordenador DELL Optiplex GX 280, Intel Pentium 4 a 3.0 GHz incorporado y software propio de Varian.
- Cromatógrafo Hewlett-Packard HPLC Mod. 1100, equipado con desgasificador, bomba cuaternaria, válvula de inyección de 6 vías, bucle de 20  $\mu$ L y detector fluorimétrico y fotométrico. 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).
- Reactor de flujo parado: MilliFlow Stopped Flow Reactor, amplía el uso del espectrómetro de luminiscencia SLM AMINCO, ya que posibilita el uso de la óptica en T permitiendo el estudio cinético de la luminiscencia (fluorescencia y fosforescencia) en reacciones rápidas. Utiliza jeringas Hamilton Gastight. Dichas jeringas están construidas 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 borosilicato. La combinación de este vidrio y el teflón proporciona un entorno inerte para la mayoría de las aplicaciones.

- Lámpara de mercurio Osram de 200 W, con una fuente de energía Oriel, modelo 8500 y carcasa metálica.
- Baño termostático Selecta, modelo Frigiterm, para el control y mantenimiento de la temperatura. Este baño es capaz de regular la temperatura entre -10 y 99 °C, con una precisión de  $\pm 0.1$  °C, mediante un sistema de circulación continuo que se adapta al portacubetas del espectrómetro de luminiscencia para mantener la temperatura de la disolución contenida en la cubeta.
- pH-metro Crison, modelo 2001, con sensibilidad de  $\pm 0.01$  unidades de pH, con electrodo combinado de vidrio y calomelanos saturado.
- Balanza Scaltec, modelo SBA 33, con una sensibilidad de  $\pm 0.1$  mg.
- Bomba peristáltica Wilson Minipuls-3, controlada por un ordenador.
- Centrífuga Selecta, modelo Angular 6.
- Sistema de obtención de agua ultrapura, Milli-Q, módulos RIOs/elix y Milli-Q).

## REACTIVOS, DISOLUCIONES Y DISOLVENTES

- Quinalphos, suministrado por Scharlab. Todas las disoluciones se prepararon diluyendo en etanol absoluto (Merck) y fueron almacenadas en el frigorífico a 4 °C.
- Ciprofloxacino (Fluka). Disolución de 100.0 mg L<sup>-1</sup> preparada por pesada de 0.0100 g y dilución hasta 100 mL con ácido sulfúrico (Panreac) 5.0x10<sup>-3</sup> M.
- Norfloxacino (Sigma). Disolución de 100.0 mg L<sup>-1</sup> preparada por pesada de 0.0100 g y dilución hasta 100 mL con ácido sulfúrico (Panreac) 5.0x10<sup>-3</sup> M.
- Ofloxacino (Sigma). Disolución de 100.0 mg L<sup>-1</sup> preparada por pesada de 0.0100 g y dilución hasta 100 mL con ácido sulfúrico (Panreac) 5.0x10<sup>-3</sup> M.
- Disolución de Ce (IV) 2.5x10<sup>-2</sup> M, preparada por dilución de sulfato de amonio y Ce (IV) dihidratado (Panreac) en ácido sulfúrico (Panreac) 4.0 M.
- Disolución de [Ru(bipy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>] 2.0x10<sup>-3</sup> M, preparada por dilución de tris (2,2'-bipiridil) diclororutenio (II) hexahidratado (Aldrich) con agua desionizada.

- Disolución de ácido fólico  $100 \text{ mg L}^{-1}$  preparada por pesada de 0.0100 g de ácido fólico (Sigma) y dilución hasta 100 mL con agua desionizada. Necesita medio básico para su solubilización.
- Disolución de metotrexato  $100 \text{ mg L}^{-1}$  preparada por pesada de 0.0100 g de metotrexato (Sigma) y dilución hasta 100 mL con agua desionizada. Necesita medio básico para su solubilización.
- Disolución de ácido 5-metil tetrahidrofólico  $100 \text{ mg L}^{-1}$  preparada por pesada de 0.0100 g de 5-metil tetrahidrofólico (Sigma) y dilución hasta 100 mL con agua desionizada. Necesita medio básico para su solubilización.
- Disolución de ácido tetrahidrofólico  $100 \text{ mg L}^{-1}$  preparada por pesada de 0.0100 g de ácido tetrahidrofólico (Sigma) y dilución hasta 100 mL con agua desionizada. Necesita medio básico para su solubilización.
- Disolución de ácido p-amino benzoico  $60 \text{ mg L}^{-1}$  preparada por pesada de 0.0060 g de ácido p-amino benzoico (Sigma) y dilución hasta 100 mL con agua desionizada.
- Disolución acuosa de procaína,  $452 \text{ mg mL}^{-1}$ , suministrada por el Laboratorio Scott Cassara, Rosario, Argentina. Su concentración se determinó mediante un método volumétrico descrito en la farmacopea<sup>1</sup>.
- Disolución reguladora 0.5 M de ácido cloroacético/cloroacetato sódico (Panreac) de pH 3.4.
- Disolución reguladora 0.04 M de ácido cloroacético/cloroacetato sódico (Panreac) de pH 4.0.
- Disolución de permanganato potásico (Panreac) contrastada frente a oxalato sódico.
- Acetonitrilo grado gradiente para cromatografía líquida de alta eficacia (Merck)
- Metanol grado gradiente para cromatografía líquida de alta eficacia (Merck).
- Disolución reguladora 0.1 M de ácido fórmico/formiato (Panreac) de pH 3.0.
- Peróxido de Hidrógeno 33% p/v (Panreac)
- Hidróxido sódico, suministrado por Panreac y Merck.
- Ácido clorhídrico suministrado por Scharlau.
- Metanol, suministrado por Panreac.

---

<sup>1</sup> *British Pharmacopoeia*, Her Majesty's Stationary Office: London, 2003, pp. 7, 94 and 258.

- Éter dietílico, suministrado por Merck.
- Ácido tricloroacético (Sigma).

## PROGRAMAS INFORMÁTICOS

- Grapher, v. 3.0, Golden Inc.Co. Colorado, USA, 2001.
- Sigma Plot, v. 9.0, Systat Software, Inc.
- Hewlett Packard ChemStation Chromatography Software. HP ChemStation Family Software Products, Hewlett Packard Co. 1997.
- THE UNSCRAMBLER, v. 6.11, que trabaja bajo el entorno Windows XP.
- MATLAB 5.3 Rev.11; *The MathWorks Inc.: Natick, M.A.; 1999*
- CAMSPEC4, programa realizado en el Departamento de Química Analítica y Tecnología de los alimentos de la Universidad de Castilla la Mancha que permita procesar los datos proporcionados por el programa CSW32.
- INTERFACE, programa realizado en el Departamento de Química Analítica de la Universidad de Extremadura, escrito bajo el entorno de programación Matlab 5.3, que permite transformar los ficheros obtenidos en el VARIAN con extensión *.csv* a archivos con extensión *.txt*, para así poder trabajar con ellos con el resto de programas empleados.
- ESCIN, programa realizado en el Departamento de Química Analítica de la Universidad de Extremadura, escrito bajo el entorno de programación Matlab 5.3, que permite realizar el cálculo de las pendientes de las curvas cinéticas.
- ACOC, programa realizado en el Departamento de Química Analítica de la Universidad de Extremadura, escrito bajo el entorno de programación Matlab 5.3, que permite realizar calibración lineal de orden cero, calculando los distintos parámetros estadísticos y de calidad de las rectas de calibrado; así como realizar el test ANOVA, test de la elipse y la pendiente, etc.
- MVC1, programa realizado por A. C. Olivieri, Universidad Nacional de Rosario, Argentina, para realizar calibración multivariante de primer orden que permite emplear 12 metodologías distintas, entre las cuales se encuentra PLS-1 (mínimos cuadrados parciales)

- MVC2, programa realizado por A. C. Olivieri, Universidad Nacional de Rosario, Argentina, para realizar calibración multivariante de segundo orden que permite emplear diversas metodologías: N-PLS (mínimos cuadrados parciales multidimensionales) y U-PLS (mínimos cuadrados parciales concatenados) combinados con RBL (bilinealización residual), PARAFAC (análisis factorial paralelo), SWATLD (descomposición trilineal alternada autoponderada) y BLLS (mínimos cuadrados bilineales) entre otras.
- MVC3, programa realizado por A. C. Olivieri, Universidad Nacional de Rosario, Argentina, para realizar calibración multivariante de tercer orden que permite emplear PARAFAC, TLLS (mínimos cuadrados trilineales), U-PLS y N-PLS combinados con RTL (trilinealización residual) entre otras.





**Capítulo I**  
**DETERMINACIÓN CINÉTICO-FLUORIMÉTRICA**  
**DE QUINALFOS EN AGUAS NATURALES**



## I.1. INTRODUCCIÓN

### *I.1.1. Consideraciones generales sobre los pesticidas*

El control de las plagas es una parte esencial para el desarrollo de cada país ya que dañan los cultivos y transmiten enfermedades. El 20% de la cosecha agrícola potencial se pierde en el propio campo, por la acción solapada e implacable de los insectos, hongos, moluscos, virus, roedores e hierbas dañinas; y todavía otro 10% más, acaba siendo destruida en los silos y almacenes por causas análogas. Las plagas o pestes dan al traste, pues, con casi la tercera parte del esfuerzo agrícola de la Humanidad, con cuyo producto podrían mantenerse seiscientos millones de personas. De ahí el rigor y la decisión con que las distintas ramas de la Ciencia y la Técnica se han enfrentado con el problema. De estas ramas, la Química ha respondido suministrando al agricultor unos productos, los pesticidas [1].

El vocablo *Pesticida* constituye un neologismo en la lengua española aunque sea muy usado en los países hispanoamericanos por influjo de los Estados Unidos. *Pesticida* es cualquier producto químico destinado a luchar contra “pestes”, o sea, parásitos, animales o vegetales, que amenazan los cultivos agrícolas, la ganadería o la salud humana. Tal definición es muy amplia, pero una tácita convención restringe su alcance: de los pesticidas se excluyen los medicamentos y productos farmacéuticos, considerando solamente como tales los productos que se emplean para combatir parásitos externos [2].

Debido a la extensión de los cultivos, el uso de productos químicos se ha extendido ampliamente para controlar las plagas, lo cual ha influido en una gran expansión en el desarrollo de pesticidas sintéticos orgánicos, siendo más de mil pesticidas los de uso común [3]. Pero el mismo hecho de su amplia utilización, indiscriminada a veces y asociada a su gran actividad química, ha dado origen a serios problemas de contaminación, por lo que son necesarios medios de control, como por

ejemplo la “lucha integrada”, considerada por la FAO (organización para los alimentos y la agricultura de las naciones unidas) como “el sistema de regulación de las poblaciones de plagas que, teniendo en cuenta el medio ambiente y la dinámica de las poblaciones consideradas, utiliza todas las técnicas y métodos apropiados de la forma más compatible posible, manteniendo las poblaciones de plagas a niveles tales que no causen daños económicos” [2].

Como ya mencionamos anteriormente, debido al uso indiscriminado de los pesticidas encontramos diversos problemas relacionados con la resistencia genética, alteraciones en el ecosistema, aparición de nuevas plagas, acumulación en la cadena trófica (bioacumulación), movilidad en el ambiente y riesgos para la salud humana.

El número de personas que mueren por pesticidas es bajo, pero decenas de miles de personas se envenenan con ellos todos los años, padeciendo síntomas más o menos graves. La mayoría son agricultores u otras personas que trabajan en contacto con los pesticidas. Sobre todo, personas poco entrenadas para su uso, en los países en vías de desarrollo, son las que sufren estos percances.

Como en el mundo actual todos estamos expuestos diariamente al contacto y a la ingestión de pequeñísimas cantidades de plaguicidas y otros productos artificiales, algunos autores sugieren que las consecuencias para la humanidad, a largo plazo, pueden ser serias. Hablan de disminución de la fertilidad, aumento en el número de cánceres, malformaciones congénitas, etc. Aunque no hay evidencia de que esto sea así, tampoco hay completa seguridad de que, el efecto a largo plazo de todo este conjunto de sustancias que estamos poniendo en el ambiente, sea totalmente inocuo.

➤ *Clasificación*

La clasificación de los pesticidas puede realizarse atendiendo a diversos criterios:

1. Atendiendo al tipo de parásito a los que se dirige fundamentalmente su acción:
  - *Insecticidas*, que luchan contra insectos (pulgones, minadores, taladradores, chupadores, cochinillas, etc.).
  - *Acaricidas*, que combaten araña roja, ácaros varios, etc.
  - *Nematicidas*, usados contra nematodos.
  - *Moluscocidas*, destinados a exterminar caracoles y babosas.
  - *Rodenticidas*, contra ratas, ratones y topillos.
  - *Fungicidas o Anticriptogámicos*, que actúan contra hongos parásitos causantes de enfermedades en los cultivos.
  - *Herbicidas*, que luchan contra malas hierbas, sea de un modo general o selectivo (dejando indemne el cultivo y destruyendo toda o buena parte de las hierbas adventicias).
  
2. Atendiendo a su poder de penetración en las plantas:
  - *Pesticidas sistémicos*: también conocidos como teleotóxicos o endoterápicos, tienen la propiedad de ser absorbidos por las plantas y se incorporan a la savia, transportándose con ella y metabolizándose en parte de la misma: la acción insecticida la ejercen sobre insectos chupadores al alimentarse éstos con la savia que contiene el tóxico. Son transportados a través de la savia a todos los órganos, permaneciendo en los mismos en bastante cantidad y durante bastante tiempo, por lo que es necesario esperar un determinado tiempo para el uso de la planta.
  
  - *Pesticidas no sistémicos*: no resultan absorbidos por la planta, por lo que su acción la ejercen sobre las plagas, sea por contacto o por ingestión.

3. Atendiendo a criterios químicos:

- *Pesticidas inorgánicos*: son los que desde más antiguo utiliza el hombre, como por ejemplo el azufre, introducido hace más de un siglo, el cobre, los arseniatos, etc. A pesar de su antigüedad estos pesticidas siguen teniendo vigencia, aunque no tan extensa como antes.

- *Pesticidas orgánicos*: pueden ser de origen vegetal o sintético.

A su vez, los pesticidas orgánicos de síntesis pueden ser agrupados como:

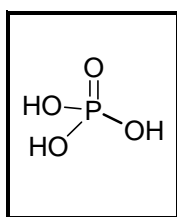
- Pesticidas organohalogenados: tienen algún átomo de halógeno en su molécula, esencialmente cloro, y poseen una alta toxicidad para los insectos. Son insecticidas persistentes y acumulativos.
- Pesticidas organofosforados: son ésteres o amidas del ácido fosfórico. Son líquidos o sólidos bastante volátiles. Se han utilizado para combatir gran cantidad de insectos, aunque algunos también poseen propiedades acaricidas o fungicidas.
- Pesticidas carbámicos: son compuestos derivados del ácido carbámico. Poseen una elevada actividad fungicida. En general, se utilizan como fungicidas los ditiocarbamatos y como insecticidas y herbicidas otros derivados carbámicos.

➤ ***Pesticidas organofosforados***

Éstos ocupan hoy un lugar preponderante entre los pesticidas más conocidos y utilizados y, a pesar de sus limitaciones, constituyen un grupo muy efectivo que es objeto de investigación continuada.

El desarrollo de esta clase de insecticidas data de muchos años atrás y fueron descubiertos en Alemania, destacándose en su estudio el químico Schrader, iniciador e investigador fecundo de tales derivados. La comercialización de estos derivados a escala mundial se efectuó por los Estados Unidos, y en la síntesis de nuevos derivados y en el estudio de su comportamiento bioquímico, han realizado estudios sobresalientes tanto autores americanos como europeos.

En general, los insecticidas fosforados pueden considerarse como derivados del ácido fosfórico (Figura I.1) y la sustitución de todos los grupos  $-OH$  por  $-OR$  (R = radical orgánico) origina ésteres del ácido fosfórico o “fosfatos”, pero caben aún más sustituciones, como por ejemplo el enlace  $P = O$  por el enlace  $P = S$ , originando así los *tiofosfatos*, grupo al que pertenece el **Quinalfos**, pesticida estudiado en este capítulo.



*Figura I.1. Ácido fosfórico.*

Los primeros fosforados utilizados pertenecían al tipo de ésteres sencillos del ácido fosfórico, como el TEPP (Figura I.2.A) y otros, a los que se añadió luego el Parathion (Figura I.2.B), primer ejemplo de tiofosfato, que a pesar de su antigüedad sigue siendo de uso común en todo el mundo, con más o menos limitaciones.

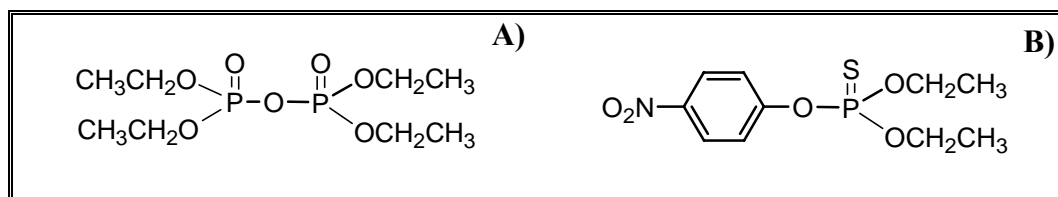


Figura 1.2. Estructuras del tetraetil pirofosfato (TEPP), A) y del O,O-dietil O-4-nitrofenil tiofosfato (Paration), B).

➤ *Mecanismo tóxico de acción*

Definida de modo general, puede decirse que la acción de los derivados fosfóricos se realiza sobre la colinesterasa [2], cuya función en el organismo animal se resume brevemente en las siguientes líneas:

El impulso nervioso producido por una excitación externa se transforma en movimiento muscular por medio de la acetilcolina que es la que impele al músculo a realizar el movimiento conveniente; el origen del estímulo y la respuesta muscular pueden ser de distintos tipos (respondiendo a estímulos externos o por exigencia de necesidades del organismo), pero en casi todos los casos, es la acetilcolina la que interviene como "transmisor" del mensaje recibido para transformarlo en movimiento.

La acumulación de acetilcolina en el organismo provoca la aparición de síntomas tóxicos que conducen a la descoordinación muscular y a la muerte; de ahí que en cuanto la acetilcolina ha cumplido su misión, sea destruida inmediatamente por la enzima "acetilcolinesterasa" (ChE), que la escinde en sus dos componentes (colina y ácido acético) que, por nuevos mecanismos, resultan inocuos al organismo. Si se detiene o inhibe el mecanismo de acción de la ChE se provoca la acumulación de acetilcolina y ocurren los síntomas tóxicos característicos ya citados, produciéndose la muerte al sobrepasar el máximo tolerado.



Como otras enzimas, la ChE actúa sobre la acetilcolina formando un complejo de vida muy breve, pero si a la colinesterasa se le presenta un sustituto de la acetilcolina, actúa sobre éste y deja en libertad a la acetilcolina que ejerce, entonces, su acción tóxica.

Los derivados fosfóricos actúan como inhibidores de la colinesterasa presentándose como “sustitutos” de la acetilcolina y a ello se debe su acción tóxica. El complejo formado por el inhibidor y la acetilcolinesterasa es más estable y menos hidrolizable que el formado por acetilcolina-ChE y, aún dentro de los derivados fosfóricos, los *metil* se hidrolizan dentro de este complejo con más facilidad que los *etil*, siendo ésta la causa de que estos últimos ostenten una toxicidad más elevada, en general, que los primeros.

➤ *Metabolismo de los derivados fosfóricos*

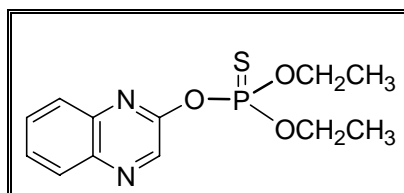
Con frecuencia, esta acción inhibidora de la colinesterasa no se efectúa directamente por el derivado fosfórico original, sino a través de metabolitos del mismo, que originan productos más tóxicos que el primitivo.

En el metabolismo de los derivados fosfóricos intervienen una serie de enzimas, no bien conocidas ni aisladas, cuya acción es muy diversa y conduce a productos metabólicos diferentes. Lo más frecuente es encontrar simultáneamente metabolitos distintos, que se han formado sucesivamente o a la vez, con predominancia de algunos tipos. Para conseguir tales transformaciones existen dos caminos: el metabolismo del producto en el cuerpo del insecto o animal estudiado, o las transformaciones que sufre al ser absorbido por la planta; este último camino es el propio de los insecticidas sistémicos.

El Quinalfos, como se dijo anteriormente, es un insecticida que presenta el grupo *tiofosfato*. En este tipo de pesticidas es muy importante el proceso de oxidación, mediante el cual se convierte la estructura *tio* en estructura *oxo* (fosfato), que es mucho más tóxica.

### *1.1.2. Características generales del Quinalfos*

Como ya hemos señalado, en este capítulo se estudia el Quinalfos, que es la designación común del compuesto O,O-dietil O-quinoxalin-2-il tiofosfato (Figura I.3).

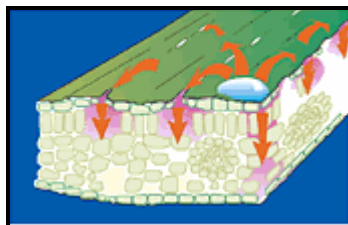


*Figura I.3. Quinalfos.*

Pertenece al grupo de los pesticidas organofosforados y fue presentado en 1969 por BAYER AG que registró la marca *Bayrusil* y por SANDOZ LTD (NOVARTIS AGRO) que registró la marca *Ekalux*.

#### ◆ *Actividad*

Insecticida acaricida que actúa por ingestión y contacto; se caracteriza por su acción penetrante (a los 3 días se encuentra en el interior de insecto y planta). De acción translaminar y cierto efecto sistémico (Figura I.4 y Figura I.5). Posee buen efecto de choque y su persistencia se estima en 10-15 días. Interfiere en la transmisión de los impulsos nerviosos por inhibición de la colinesterasa.



*Figura I.4. Acción sistémica: difunde en la capa cerosa de las hojas y frutos garantizando de esta manera una muy buena redistribución.*



Figura I.5. Acción translaminar: alcanza igual efectividad sobre la superficie de la hoja opuesta que no tuvo contacto con la solución.

#### ◆ Características Fisicoquímicas

Es un sólido cristalino, incoloro, estable en condiciones normales de almacenamiento si se diluye en disolventes orgánicos no polares y en presencia de agentes estabilizadores. Susceptible de hidrólisis (en sistemas acuosos amortiguadores a 24 °C, el 50% se descompone en 56 días a pH 5, en 40 días a pH 7 y en 30 días a pH 9). Sensible al calor pero es estable hasta 50 °C. Estable a la luz.

*Densidad:* a 20 °C 1,235 g/cc.

*Punto de fusión:* 31-32 °C.

*Punto de ebullición:* 142 °C a 0,0003 mmHg (con descomposición).

*Solubilidad:* a 24 °C: agua 22 mg/L, hexano 250 g/L. Soluble en acetato de etilo, acetona, acetonitrilo, etanol, dietiléter, metanol, tolueno, xileno. Ligeramente soluble en petróleo ligero.

#### ◆ Toxicidad

Consideramos tres clases de toxicidad por lo que a sus efectos más inmediatos se refiere:

1. *Toxicidad oral aguda:* se refiere a la ingestión “de una sola vez” de un producto pesticida tóxico. Se expresa en términos de “Dosis letal media”, DL-50, que significa la *cantidad de tóxico que es necesario ingerir de una vez para producir la muerte del 50% de los animales en ensayo*. Se expresa, normalmente, en miligramos por kilo de animal ensayado.

2. *Toxicidad dérmica*: se refiere a los riesgos tóxicos debidos al contacto y absorción del pesticida por la piel. Al igual que la anterior se expresa en términos de DL-50 y en miligramos/kilo.
3. *Toxicidad crónica*: a través de dietas alimentarias preparadas con dosis variadas del tóxico que se estudia, se averiguan los niveles de riesgo del pesticida a través de su administración diaria a los animales en ensayo durante largo tiempo. Generalmente, los ensayos duran un par de años, pero también se hacen a más corto plazo (6 meses, 90 días, 2-4 semanas, etc). En este caso, se les prefiere denominar “toxicidad subaguda” o bien “subcrónica”.

En la Tabla I.1 se recogen los valores de toxicidad para el quinalfos.

Tabla I.1. Toxicidad del quinalfos ensayada en ratas.

<b>Toxicidad Aguda: Valores DL-50</b>		<b>Toxicidad Crónica</b>		
<b>mg/Kg</b>		<b>Tiempo</b>	<b>Dosis</b>	<b>Efecto</b>
Oral	Dérmica	Tiempo	Dosis	Efecto
Ra 62-137	Ra 1250-1400	90 d. Ra	10 ppm	Leve efto. ChE

#### ◆ *Aplicaciones*

Se utiliza de 0,2-1 kg sustancia activa/hectárea en el control de *Cerop-lastes sinensis*, *Chrysomphalus dictyospermi*, *Lepi-dosaphes ulmi*, *Parlatoria oleae*, *P. pergandii*, *Pla-nococcus citri*, *Quadraspidiotus perniciosus*, *Sai-ssetia oleae* y otros cóccidos; *Aphis spiraecola*, *Eri-osoma lanigerum*, *Toxoptera aurantii* y otros áfidos (excepto *Myzus persicae*), *Cacopsylla pyri*, *Eupoecilia ambiguella*, *Gortyna xanthenes*, *Lepti-notarsa decemlineata*, *Lobesia botrana*, *Sparga-nothis pilleriana*, *Prays citri*, *P. oleae*, *tripses* y otros insectos en cultivos de alcachofa, algodón, arroz, cacahuete, café, cereales, cítricos, frutales de hoja caduca, hortícolas, olivo, ornamentales, parral de vid, patata, remolacha, soja, té y vid. Se aconseja aplicar antes de que las cochinillas formen

su caparazón protector. También se ha utilizado en suelos como protección contra gusanos grises.

Es compatible con la mayoría de los pesticidas, excepto con los de reacción alcalina. Puede formularse con otros pesticidas organofosforados.

◆ *Metabolismo y residuos*

En el suelo se degrada rápidamente en condiciones aerobias. El principal metabolito es la 2-hidroxiquinoxalina (libre y sus conjugados). Este producto de hidrólisis no se acumula en el suelo ya que se descompone en metabolitos polares y CO<sub>2</sub>. Cuando se aplica sobre las plantas, un tercio es absorbido por la superficie de las hojas y penetra en la planta, mientras que los otros dos tercios desaparecen por evaporación en 14 días. Las ratas lo absorben rápidamente, lo metabolizan a 2-hidroxiquinoxalina (libre y sus conjugados) y lo excretan en la orina en un corto plazo.

Los límites máximos\* permitidos de residuos (LMR) del quinalfos en diferentes vegetales se muestran en la Tabla I.2.

*Tabla I.2. LMR, suma de quinalfos y de su análogo oxigenado.*

Frutos cítricos, uvas de mesa y vinificación y alcachofas	0,3 ppm
Frutos de pepita y de hueso y aceitunas	0,2 ppm
Leguminosas verdes frescas	0,1 ppm
Los demás productos vegetales	0,01 ppm

---

\* BOE de 9 de marzo de 1994.

◆ *Intoxicación*

Los síntomas son los causados por la inhibición de la colinesterasa: sudoración excesiva, salivación, dolor de cabeza, debilidad, vértigo, náuseas, dolor de estómago, visión borrosa, espasmos musculares. Se utiliza como antídoto la *atropina* (inyección de 2-4 mg cada 15 minutos hasta atropinización total) con PAM u obi-doxima. Provocar vómito y obtener atención médica.

***1.1.3. Revisión bibliográfica***

Para la determinación cuantitativa de quinalfos se han propuesto diversos métodos, la mayoría basados en técnicas cromatográficas y, más concretamente, cromatografía de gases, Tabla I.3. Sin embargo, este compuesto es muy sensible al calor, por lo que es muy probable su descomposición en la columna, siendo más conveniente emplear métodos donde la cromatografía de gases no esté implicada.

También se han desarrollado métodos donde se han utilizado la espectrofotometría UV-Visible [15] y la espectrofluorimetría normal y sincrónica [16], como técnicas de detección sin etapa separativa previa. En ambos métodos se determina el quinalfos de forma indirecta.

Por último, hemos encontrado una referencia donde el quinalfos se determina gravimétricamente a partir de su reacción con cloruro de cobre (I) [17].

Tabla I.3. Métodos cromatográficos para la determinación de quinalfos.

ANALITOS	MEDIO	PROCEDIMIENTO CROMATOGRÁFICO	DETECCIÓN	COMENTARIOS	CITA
Quinalfos	Formulación comercial y vegetales (patata, coliflor y repollo)	HPLC	Espectrofotometría UV-Visible	$\lambda = 245 \text{ nm}$	[4]
35 pesticidas (incluido quinalfos)	Aguas	LC	MS/MS	- SPE en línea con CL. Fase sólida C <sub>18</sub> . - Ionización electrospray (ESI).	[5]
58 pesticidas (incluido quinalfos)	Extractos de zanahoria y apio	GC x GC	TOF MS	Sistema modulado criogénicamente con CO <sub>2</sub>	[6]
61 pesticidas (incluido quinalfos)	Suero humano	GC	MS	SPE previa a GC con cartuchos con soporte polimérico.	[7]
29 pesticidas (incluido quinalfos)	Suero y sangre	GC	MS	SPE previa a GC con cartuchos con soporte polimérico	[8]
12 pesticidas (incluido quinalfos)	Uvas, vino y mosto	GC	NPD y MS		[9]
18 pesticidas (incluido quinalfos)	Miel de abejas	GC	NPD	SPME acoplado a GC. Fibras de poliacrilato (PA) y polidimetilsiloxano (PDMS).	[10]
Pesticidas organofosforados (incluido quinalfos) y carbamatos	Abejas	GC	NPD y MS	Paso previo de limpieza mediante GPC	[11]
Pesticidas organofosforados (incluido quinalfos)	Pera y zumo de pera	GC	Detector fotométrico de llama en modo fósforo	SPME acoplado a GC. Fibras de PDMS.	[12]
4 pesticidas (incluido quinalfos)	Agua	Micro-LC	Espectrofotometría UV-Visible	$\lambda = 245 \text{ nm}$ Pretratamiento de la muestra con microextracción en fase líquida	[13]
Quinalfos	Sangre y orina	GC	MS	SPME acoplado a GC.	[14]

Nos ha interesado principalmente la técnica de fluorescencia como sistema de detección, pues permite muy buenos límites de detección, pudiéndose de esta forma determinar pequeñas cantidades de numerosos compuestos orgánicos.

Nos proponemos desarrollar un método cinético-fluorimétrico para determinar este pesticida, que es por sí mismo poco fluorescente, pero que genera un producto muy fluorescente, quinoxalin-2-ol, en medio alcalino, permitiendo esta reacción de hidrólisis determinar pequeñas cantidades del pesticida [16]. Para ello, acoplaremos esta técnica a sistemas de flujo (stopped-flow) y compararemos los resultados con los obtenidos en modo clásico (mezcla manual de reactivos). Además, optimizaremos un proceso previo de extracción en fase sólida con objeto de aplicar el método desarrollado en diversas muestras de aguas.

El Departamento de Química Analítica tiene una amplia experiencia en la utilización de señales cinéticas como señales analíticas. Así, se han desarrollado métodos cinéticos con detección fotométrica para la determinación de diversos compuestos, como *furazolidona* y *furaltadona* a partir de su reacción de hidrólisis en medio básico [18], también se ha empleado la técnica de stopped flow para la determinación de estos mismos compuestos, [19].

Del mismo modo, se ha llevado a cabo la determinación de *diquat* en muestras acuosas, para ello, el método cinético-fotométrico desarrollado se ha basado en la reacción del herbicida con peróxido de hidrógeno [20], se han determinado las ansamicinas *rifamicina* y *rifampicina* a partir de su oxidación con oxígeno atmosférico catalizada por Cu (II) [21], los aldehídos furánicos *5-hidroximetil-2-furfural* y *furfural* mediante su reacción con ácido 2-tiobarbitúrico [22], los pesticidas organofosforados *clorpirifos* [23] y *fosalona* [24] a partir de la degradación en medio básico. Por último, se ha desarrollado un método cinético-fotométrico para la determinación simultánea de los pesticidas *dinoseb* y *dinobuton*, originándose el segundo a partir de la hidrólisis del primero en medio básico [25].



También se han desarrollado métodos cinéticos con detección fluorimétrica para determinar diversos compuestos en suero humano, como malonaldehído a partir de su reacción con ácido tiobarbitúrico [26] y metotrexano a partir de su oxidación con permanganato potásico en medio ácido [27]. El malonaldehído también se ha determinado en aceites de oliva a partir de la reacción de Hantzsch [28].

La utilización del módulo de stopped flow acoplado al espectrofluorímetro se ha empleado para determinar amoxicilina y ácido clavulánico en fármacos a partir de su reacción de oxidación con Ce (IV), empleando calibración multivariante por mínimos cuadrados parciales, PLS [29], técnica de calibración que se comparó en un trabajo posterior con métodos basados en la señal neta del analito, NBMs [30]. Finalmente, se llevó a cabo el análisis del ácido folínico, *leucovorin*, en muestras de orina, a partir de su oxidación con permanganato potásico [31].

El sistema de flujo stopped flow se ha empleado, además, en la determinación cinética de dipiridamol en fármacos, mediante detección fosforescente a temperatura ambiente en medio micelar [32].

#### ***1.1.4. Características generales de los métodos cinéticos de análisis***

El análisis químico, la rama de la química analítica basada en el uso de reacciones químicas, puede considerarse constituido por dos áreas que dependen en maneras diferentes de realizar las mediciones. Esas dos áreas son: 1) métodos basados en medidas realizadas con el sistema en equilibrio (*métodos termodinámicos*), y 2) métodos basados en medidas realizadas con el sistema evolucionando hacia la posición de equilibrio (*métodos cinéticos*) [33].

Los métodos cinéticos de análisis son aplicados a sistemas químicos durante el transcurso de una reacción, y muchas veces lo son solamente durante el período que sigue inmediatamente al inicio de la misma. No requieren la medición del valor absoluto del parámetro elegido para seguir la reacción (por ejemplo, la fluorescencia

de un reactivo o de un producto en dicha 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 otras sustancias fluorescentes) pero que no intervienen en la reacción y que, por lo tanto, no modifican la ley de variación del parámetro. Además, el estado dinámico del sistema que se mide somete a los métodos cinéticos de análisis a unas exigencias muy rígidas, no sólo en relación con la precisión y la sensibilidad de los instrumentos de medida del parámetro citado, sino también y muy especialmente en relación con el control de las condiciones experimentales, y exige también la medida exacta y precisa del tiempo, exigencias que no han podido ser satisfechas hasta la introducción de la instrumentación moderna.

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 reacciones *rápidas*, ser *completas*, y tener lugar con una *estequiometría definida*. Se pueden basar sin dificultad 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. Estos métodos también pueden basarse en reacciones no estequiométricas que vayan acompañadas de reacciones secundarias o consecutivas, y también en reacciones reversibles con posiciones desfavorables del equilibrio, si aquello que se mide es la *velocidad inicial* de la reacción, o la velocidad en las proximidades del momento inicial, cuando sólo ha sido transformado de un 3 a un 5 % del total del componente principal a determinar y la reacción transcurre todavía limpiamente, toda vez que los productos de reacción no se han acumulado aún en cantidad suficiente para hacer apreciables los efectos de la reacción inversa o de las reacciones parásitas.

◆ *Aspectos generales de la instrumentación para medir la velocidad de reacción*

La instrumentación para llevar a cabo un método cinético presenta varias peculiaridades que deben resaltarse desde el primer momento: el control del tiempo, la medición relativa de la señal, los sistemas de toma y tratamiento de datos y el control de temperatura.

El *tiempo* es la característica diferenciadora esencial entre 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 este último sea lo suficientemente alta. En los métodos analíticos de equilibrio se trabaja a temperatura ambiente o calentando a un determinado nivel, no afectando de manera espectacular pequeños cambios de la misma. Por el contrario, en los métodos cinéticos esta variable debe controlarse con gran precisión ( $\pm 0,01$  ó  $\pm 0,1$  °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 lo tanto, el valor absoluto de la absorbancia, intensidad de fluorescencia, 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 debe hacerse con precisión en función del tiempo. Por otra parte, al no existir una relación matemática simple entre estos datos y los valores de concentración del analito, son necesarios 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, de integración, de extrapolación logarítmica, de las ecuaciones proporcionales, etc.). En estos casos, se ha demostrado fehacientemente la necesidad de un tratamiento automatizado de los datos, especialmente en el análisis de mezclas.

En este trabajo se realizarán dos procedimientos para llevar a cabo las determinaciones cinéticas: modo clásico y modo en flujo detenido. En el primer caso, se mezclarán los reactivos manualmente en la cubeta de medida, en el segundo, se acoplará al espectrofluorímetro un módulo stopped-flow.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN



## **I.2. DETERMINACIÓN CINÉTICA DE QUINALFOS EN MODO CLÁSICO**

Como ya se ha indicado en la introducción de este capítulo, el quinalfos sufre un proceso de hidrólisis en medio básico, originando un compuesto altamente fluorescente. Este proceso no es instantáneo por lo que, en este capítulo, nos proponemos estudiar y optimizar tanto las variables instrumentales como las químicas, con objeto de proponer un método cinético para la determinación de quinalfos.

### ***I.2.1. Estudio espectrofluorimétrico de quinalfos***

La hidrólisis del quinalfos en medio alcalino tiene lugar mediante un ataque nucleofílico en el átomo de fósforo, de acuerdo con el mecanismo propuesto por García Sánchez y col. [16] mostrado en la Figura I.6.

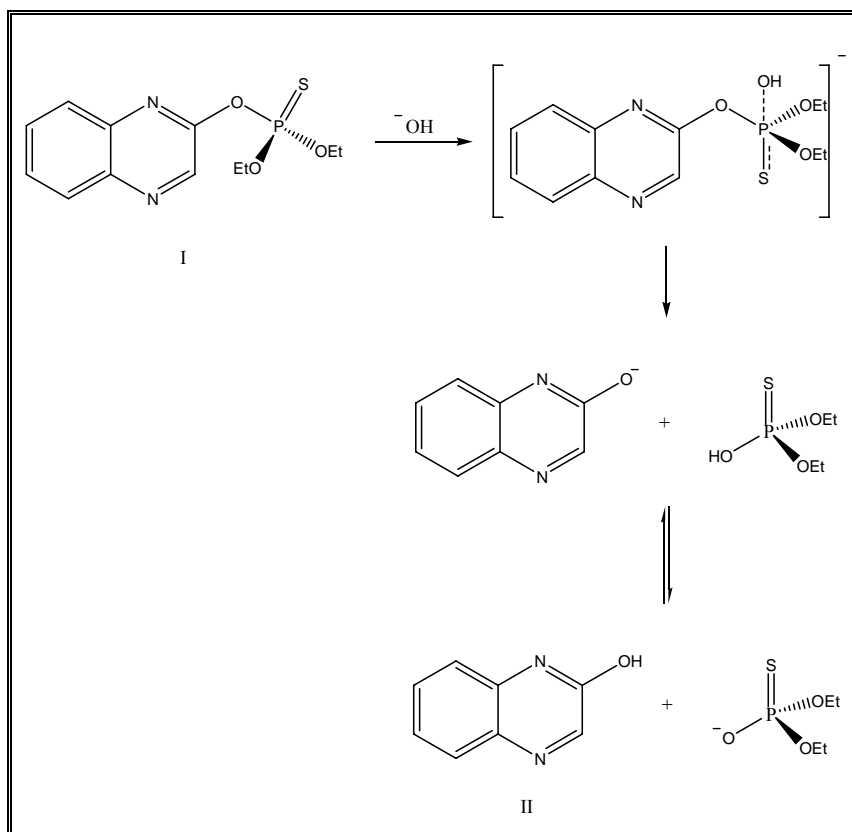


Figura I.6. Mecanismo de la hidrólisis alcalina de quinalfos (I) a quinoxalin-2-ol (II).

La fluorescencia nativa del quinalfos es muy baja, sin embargo, su producto de hidrólisis es altamente fluorescente. En la Figura I.7 se reúnen los espectros de excitación y emisión de una disolución de quinalfos de  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  en etanol (1, 2), en etanol/agua 30/70 (v/v) (1', 2') y de su producto de hidrólisis, en medio alcalino obtenido con hidróxido sódico 0.75 M, en etanol/agua 30/70 (v/v) (1'', 2'') a temperatura ambiente. Los máximos de excitación y emisión del quinalfos en etanol se localizaron a 362 y 406 nm, respectivamente, observándose un aumento de la intensidad de fluorescencia del quinalfos y un ligero desplazamiento del máximo de excitación a 356 nm y del máximo de emisión a 416, nm al aumentar la polaridad del disolvente.



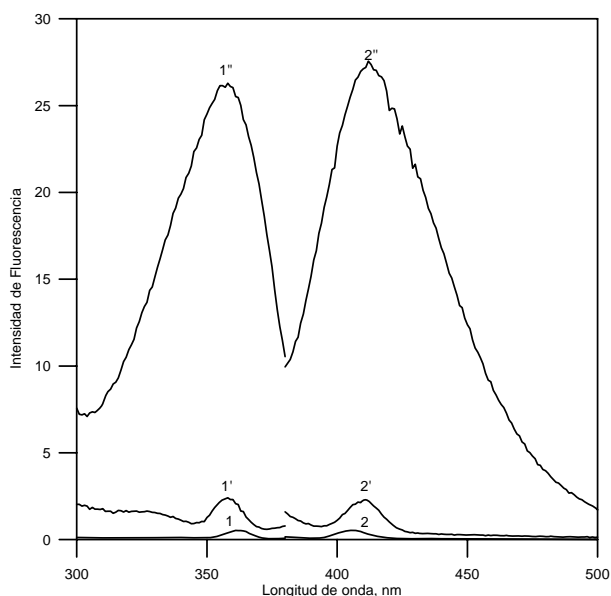


Figura I.7. Espectros de excitación y emisión de quinalfos en etanol (1, 2), en etanol/agua 30/70 (v/v) (1', 2') y de su producto de hidrólisis (1'', 2'') en etanol/agua, 30/70 (v/v). Condiciones:  $\lambda_{exc} = 362 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 406 \text{ nm}$ ; Voltaje del fotomultiplicador = 750 V; Rendijas monocromadores ex/em = 8/8 nm. Velocidad de barrido = 8 nm/seg.

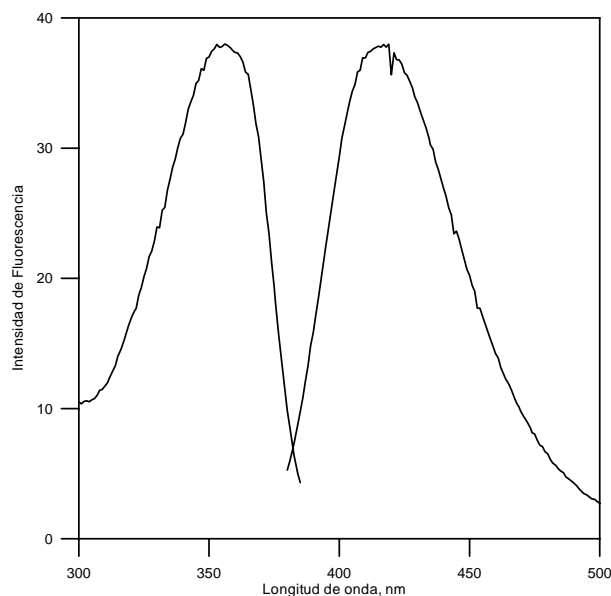
En la figura anterior observamos que la intensidad de fluorescencia de los espectros de excitación y emisión del quinoxalin-2-ol es mucho mayor que la del quinalfos. Por tanto, desarrollaremos un método *cinético fluorimétrico* para la determinación *indirecta* del pesticida.

En la bibliografía, se han establecido los espectros de fluorescencia del quinoxalin-2-ol en distintos disolventes [16] y, en todos los casos, los mejores resultados se obtuvieron cuando la hidrólisis se llevaba a cabo en mezclas etanol/agua.

### ***1.2.2. Procedimiento de trabajo. Optimización de las variables químicas***

Los estudios cinéticos básicos de la hidrólisis de quinalfos, se llevaron a cabo mezclando manualmente los reactivos en la cubeta de medida del espectrofluorímetro, añadiendo el hidróxido sódico en último lugar y registrando las correspondientes curvas cinéticas de desarrollo de la fluorescencia. Las variables experimentales que influyen en el desarrollo de la curva fluorescente, fueron optimizadas secuencialmente.

La selección de las longitudes de onda a las cuales vamos a registrar las curvas cinéticas, se realizó preparando una disolución de quinalfos en medio básico, a la que se registraron los espectros de excitación y emisión al cabo de 30 minutos, Figura I.8. Se observa que los máximos de excitación y emisión no varían apreciablemente antes y después de la hidrólisis, por lo que seleccionamos como longitud de onda de excitación 356 nm y de emisión 416 nm.



*Figura I.8. Espectros de excitación y emisión del producto de hidrólisis de  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  quinalfos en medio NaOH 0.75 M en etanol/agua 30/70 (v/v). Condiciones:  $\lambda_{exc} = 356 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{em} = 416 \text{ nm}$ ; Voltaje del fotomultiplicador = 750 V; Rendijas monocromadores ex/em = 8/8 nm; Velocidad de barrido = 8 nm/seg.*

En las curvas de desarrollo de la fluorescencia en esta reacción de hidrólisis, observamos dos zonas, una primera etapa en la que aumenta la fluorescencia con el tiempo, debido a la formación del producto de hidrólisis del quinalfos, el quinoxalin-2-ol y, un segundo periodo, en el que la reacción se ha completado y la intensidad de fluorescencia máxima se mantiene prácticamente constante. La máxima señal fluorescente se alcanza antes de los 100 segundos (Figura I.9).

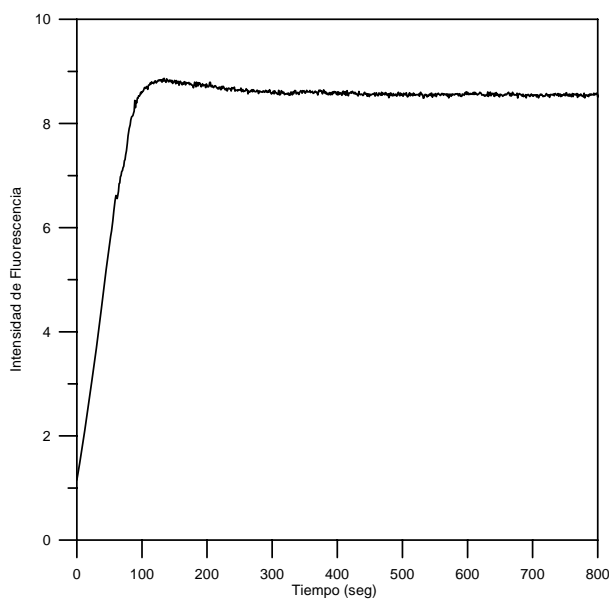


Figura I.9. Curva de hidrólisis de  $2 \mu\text{g mL}^{-1}$  de quinalfos en disolución acuosa al 5 % en etanol, hidróxido sódico 1.5 M. Temperatura =  $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Para realizar los cálculos de las pendientes se utilizó el programa informático ESCIN [34], desarrollado en el Departamento de Química Analítica de la Universidad de Extremadura. Este programa ha sido escrito bajo el entorno de programación MATLAB 5.03.

Con este programa podemos realizar los cálculos cinéticos que necesitamos, permitiéndonos operar de dos modos:

1. Calculando la pendiente de la curva cinética entre un tiempo inicial y final determinado.
2. Buscar el tramo de la curva cinética de mayor pendiente, es decir, el tramo de mayor velocidad. Para ello, bastará con indicar el ancho de la ventana de tiempos que barrerá toda la curva, expresado como número de puntos experimentales.

Para realizar este estudio procederemos de los dos modos anteriormente descritos, con objeto de determinar si existen diferencias significativas entre ambas formas de medir la velocidad de reacción.

En primer lugar, seleccionamos el intervalo de tiempos de las curvas cinéticas en el cual determinaremos las pendientes, con ayuda del programa informático ESCIN. Para ello, probamos con distintos anchos de ventana de tiempos, y llegamos a un compromiso para que, en el intervalo seleccionado, logremos que en la mayor parte de las curvas estudiadas, el valor de pendiente determinado sea lo mayor posible, siendo el coeficiente de ajuste de regresión lineal no inferior a 0.99, y utilizando el mayor número de puntos experimentales posibles. De este modo, seleccionamos como intervalo óptimo para medir las pendientes de las curvas cinéticas, el comprendido entre los *10 y 60 segundos*. Además, buscamos el tramo de pendiente máxima de cada curva cinética, que se corresponde con la velocidad máxima. Para ello, también utilizaremos un intervalo de *50 segundos*, que se corresponde con 51 puntos experimentales.

En algunas curvas coincidirá la velocidad determinada entre un tiempo inicial y final fijo, con la velocidad máxima, determinada entre un tiempo inicial y final variable.

Las variables experimentales optimizadas fueron el porcentaje de etanol, la concentración de hidróxido sódico, la temperatura y el orden de adición de los reactivos en la cubeta de medida.

Se registraron las correspondientes curvas cinéticas entre tiempo cero, momento en que se mezclan los reactivos, hasta los 900 segundos, con una resolución de 1 segundo.

➤ *Influencia del porcentaje de etanol*

Para llevar a cabo este estudio, las disoluciones, preparadas directamente en la cubeta de medida, contenían en un volumen final de 3 ml:  $2.5 \mu\text{g mL}^{-1}$  de quinalfos, NaOH 1.2 M y cantidades variables de etanol comprendidas entre 5 y 50 %. La temperatura se mantuvo a 40 °C.

Se observó que al disminuir el porcentaje de etanol aumentaba la intensidad de fluorescencia de nuestro producto, por lo que las rendijas de emisión y excitación se fijaron en 4 nm y el voltaje del fotomultiplicador en 700 V, con objeto de evitar la saturación del detector. Como se indicó anteriormente, los monocromadores se fijaron en 356 y 416 nm, para excitación y emisión, respectivamente. Así, se registraron las curvas cinéticas, entre 0 y 900 segundos, Figura I.10, observándose que la velocidad de reacción aumenta y que el equilibrio tarda menos en alcanzarse a medida que disminuye el porcentaje de etanol en la muestra.

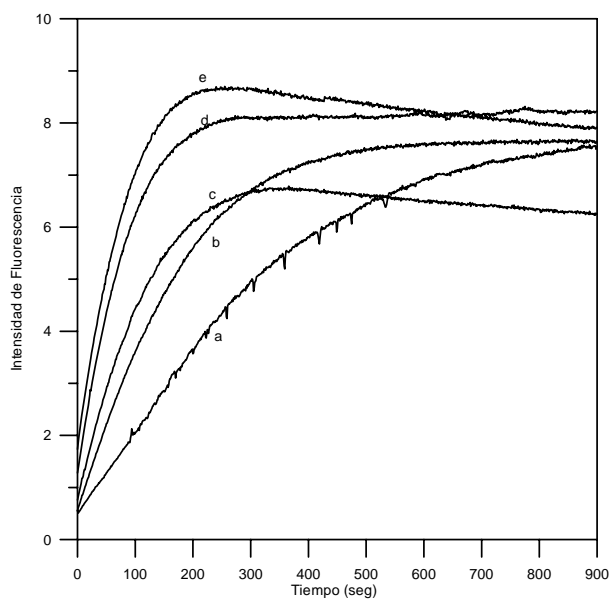


Figura I.10. Curvas cinéticas de la hidrólisis de  $2.5 \mu\text{g mL}^{-1}$  de quinalfos obtenidas variando el porcentaje de etanol, a: 50 %, b: 30 %, c: 20 %, d: 10 %, e: 5 %.  $\lambda_{\text{ex}} = 356 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 416 \text{ nm}$ .  $[\text{NaOH}]$ : 1.2 M.

Tabla I.4 se recogen los datos obtenidos al medir la velocidad de reacción utilizando los dos métodos indicados anteriormente y, en la Figura I.11, se representa la variación de la velocidad de reacción de hidrólisis de quinalfos en función del porcentaje de etanol.

Tabla I.4. Velocidad de reacción en función del porcentaje de etanol.

Etanol (%)	Velocidad ( $t_0$ : 10, $t_f$ : 60), ( $\text{s}^{-1}$ )	Velocidad máxima ( $\Delta t$ : 50), ( $\text{s}^{-1}$ )
5	0.0598	0.0652
10	0.0566	0.0614
20	0.0406	0.0425
30	0.0323	0.0329
50	0.0152	0.0177

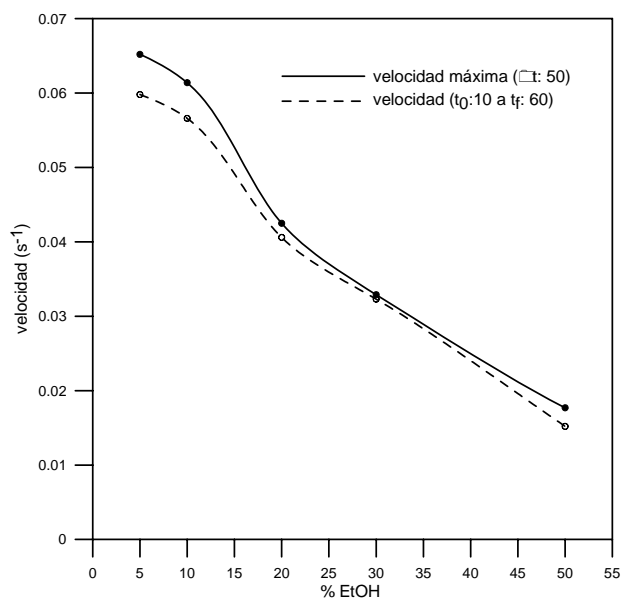


Figura I.11. Influencia del porcentaje de etanol en la velocidad de hidrólisis del quinalfos.

No observamos diferencias significativas entre ambos métodos, por lo tanto, concluimos que, independientemente del modo que elijamos para determinar la velocidad de reacción, la cinética de hidrólisis del quinalfos se ve desfavorecida al aumentar el porcentaje de etanol en el medio de reacción. Esto puede ser debido a que, según el mecanismo de reacción propuesto en la Figura I.6, la reacción transcurre mediante un intermedio de reacción cargado, que se verá más estabilizado cuanto mayor sea la capacidad de solvatación del disolvente en el medio de reacción, es decir, cuanto mayor sea el porcentaje de agua presente. Además, se comprobó que la intensidad de fluorescencia del quinoxalin-2-ol disminuía al aumentar el porcentaje de etanol en el medio.

A pesar de esta influencia negativa, es necesario mantener un porcentaje de etanol mínimo, debido a que las disoluciones patrón del pesticida se preparan en etanol (debido a su baja solubilidad en agua). Por lo tanto, para sucesivos estudios fijamos un porcentaje de etanol mínimo que es del 5 %.

Previamente, se estudió la estabilidad de las disoluciones madres de quinalfos en etanol, comprobándose que éstas permanecían estables al menos durante 15 días.

Mediante análisis logarítmico, calculamos el orden de reacción parcial respecto al porcentaje de etanol en el medio de reacción ya que, como acabamos de comprobar, éste influye en la velocidad global de reacción.

La ecuación de velocidad de esta reacción de hidrólisis de quinalfos la podemos escribir:

$$v = K [\text{EtOH}]^a [\text{OH}^-]^b [\text{quinalfos}]^c \quad (\text{ec. I.1.})$$

Manteniendo constantes el resto de las variables, podemos modificar la ecuación I.1 del siguiente modo:

$$v = K' [\text{EtOH}]^a \quad (\text{ec. I.2.})$$

donde  $K'$  engloba a la constante de velocidad de la reacción y a las concentraciones de quinalfos e hidróxido sódico, que se mantienen constantes. Tomando logaritmos en la ecuación I.2 obtenemos la siguiente expresión, que podemos representar gráficamente y determinar  $a$ , orden de reacción parcial respecto al porcentaje de etanol en el medio de reacción.

$$\ln v = \ln K' + a \ln[\text{EtOH}] \quad (\text{ec. I.3.})$$

En las Figuras I.12.A y I.12.B representamos la variación del logaritmo de la velocidad de reacción frente al logaritmo del porcentaje de etanol.



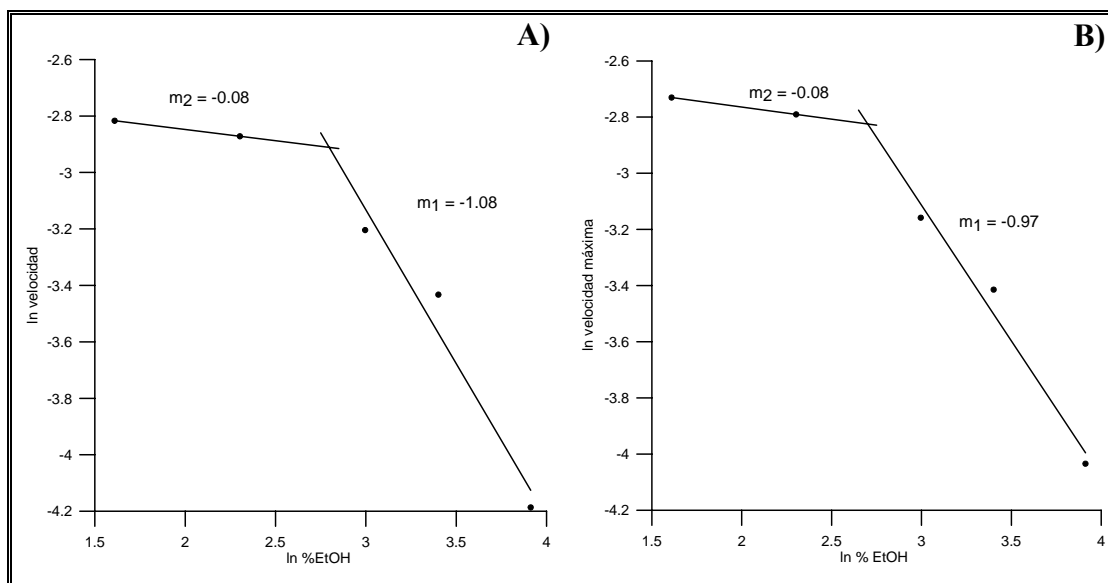


Figura 1.12. Representación logarítmica de la velocidad de reacción en función del porcentaje de EtOH. Velocidad determinada entre  $t_0$ : 10 y  $t_f$ : 60 seg, A) y velocidad determinada en  $\Delta t$ : 50 seg, B).

Observando las dos gráficas anteriores llegamos a la misma conclusión, existen dos tramos con diferentes pendientes,  $m_1$  y  $m_2$ , por lo que tenemos dos órdenes de reacción respecto al etanol:

$$\% \text{ EtOH} < 15 \% \Rightarrow a \sim 0 \Rightarrow v = K'$$

$$\% \text{ EtOH} > 15 \% \Rightarrow a \sim -1 \Rightarrow v = K' [\text{EtOH}]^{-1}$$

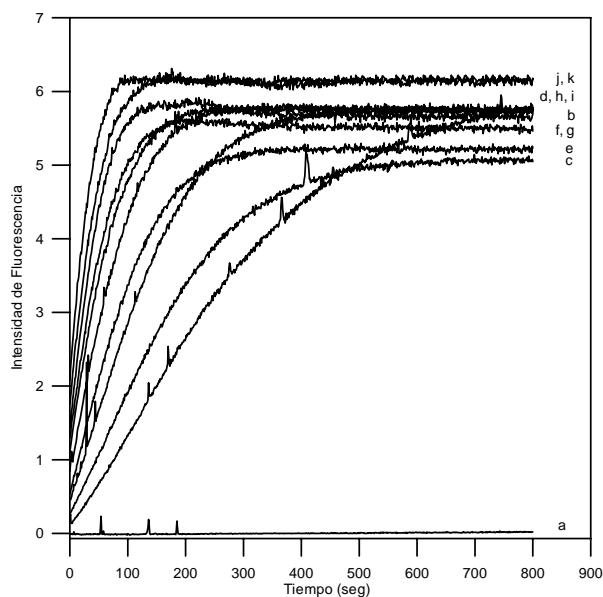
Con el porcentaje de etanol seleccionado previamente nos aseguramos un orden de reacción 0, con lo que pequeñas variaciones de la cantidad de etanol no afectarán, de forma apreciable, a la velocidad de hidrólisis.

➤ *Influencia de la concentración de hidróxido sódico*

Una vez optimizado el porcentaje de etanol (5%), estudiamos la influencia de la concentración de hidróxido sódico en la velocidad de reacción de hidrólisis de quinalfos.

Preparamos las disoluciones directamente en la cubeta de medida manteniendo una concentración de  $2 \mu\text{g mL}^{-1}$  de quinalfos, 5 % de etanol y variando la concentración de hidróxido sódico entre 0 y 3.0 M. El volumen final, en todos los casos es de 3 mL. Mantenemos la temperatura a 40 °C.

En la Figura I.13, se representan las curvas cinéticas registradas entre 0 y 800 segundos, y en la Tabla I.5 se resumen los valores de velocidad obtenidos, aplicando los dos métodos de medida.



*Figura I.13. Curvas cinéticas de la reacción de hidrólisis de  $2 \mu\text{g mL}^{-1}$  de quinalfos en función de la concentración de NaOH. Etanol 5 %. Temperatura: 40 °C. a: 0 M NaOH, b: 0.25 M NaOH, c: 0.5 M NaOH, d: 0.7 M NaOH, e: 1 M NaOH, f: 1.25 M NaOH, g: 1.5 M NaOH, h: 1.8 M NaOH, i: 2.1 M NaOH, j: 2.5 M NaOH, k: 2.85 M NaOH.*

Tabla I.5. Velocidad de reacción en función de la concentración de NaOH a 40 °C.

[NaOH], M	Velocidad ( $t_0$ : 10, $t_f$ : 60), ( $s^{-1}$ )	Velocidad máxima ( $\Delta t$ : 50), ( $s^{-1}$ )
0	0.0007	0.0012
0.25	0.0118	0.0142
0.50	0.0162	0.0173
0.70	0.0245	0.0255
1.00	0.0307	0.0312
1.25	0.0398	0.0410
1.50	0.0440	0.0472
1.80	0.0457	0.0504
2.10	0.0516	0.0601
2.50	0.0529	0.0594
2.85	0.0529	0.0651

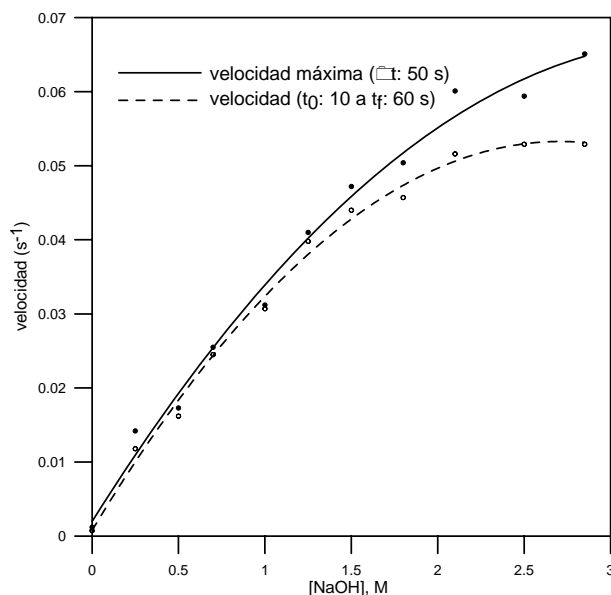


Figura I.14. Variación de la velocidad de reacción de hidrólisis de  $2 \mu g mL^{-1}$  de quinalfos en función de la concentración de NaOH a 40 °C.

Se observa que la velocidad de reacción aumenta con la concentración de hidróxido sódico, haciéndose esta relación menos dependiente para valores de concentraciones de NaOH superiores a 2.0 M, Figura I.14.

En las medidas de velocidad realizadas entre  $t_0$ : 10 y  $t_f$ : 60 segundos, podemos concluir que, para concentraciones superiores a 2 M, la velocidad de reacción es prácticamente independiente de la concentración de NaOH, siendo adecuado elegir una concentración perteneciente a este intervalo, con objeto de evitar que pequeñas variaciones en la concentración de NaOH produzcan grandes cambios en la velocidad. No obstante, elegir una concentración de hidróxido sódico muy elevada puede ser desfavorable, pues se pueden producir procesos de descomposición de nuestro producto [16]. Por lo tanto, realizaremos un nuevo estudio de la influencia de la concentración de hidróxido sódico aumentando la temperatura y disminuyendo la concentración de quinalfos, con el fin de encontrar esta meseta a valores inferiores de concentración de NaOH.

Para ello, preparamos disoluciones de quinalfos de  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ , en las que el porcentaje de etanol se mantiene en el 5 % y la concentración de NaOH se varía entre 0 y 2.5 M. la temperatura la aumentamos hasta 60 °C. En la Tabla I.6 se reúnen los valores encontrados y, en la Figura I.15, se representa la variación de la velocidad de reacción de  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  de quinalfos en función de la concentración de NaOH. A esta temperatura, las curvas registradas presentan mayor ruido, por tanto, se suavizan utilizando el algoritmo de Savitsky-Golay (opción del programa AB2).

*Tabla I.6. Velocidad de reacción en función de la concentración de NaOH a 60 °C.*

<b>[NaOH], M</b>	<b>Velocidad (<math>t_0</math>: 10, <math>t_f</math>: 60), (<math>\text{s}^{-1}</math>)</b>	<b>Velocidad máxima (<math>\Delta t</math>: 50), (<math>\text{s}^{-1}</math>)</b>
0	-0.0001	0.0001
0.5	0.0164	0.0174
1.5	0.0264	0.0315
2.5	0.0255	0.0325

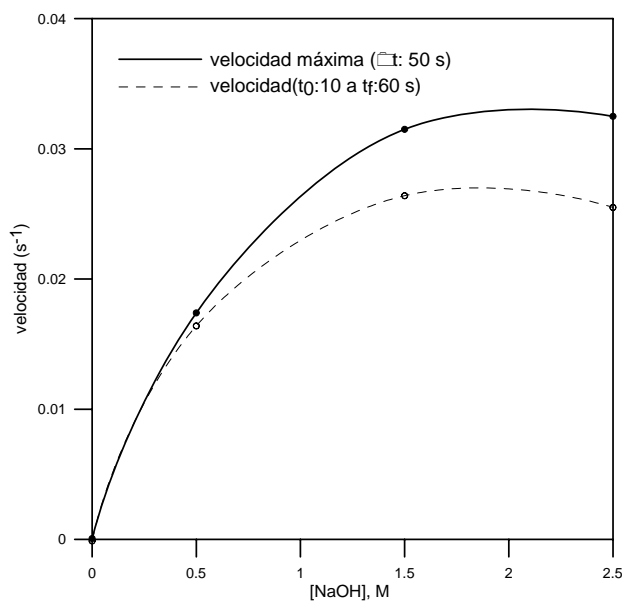


Figura I.15. Variación de la velocidad de reacción de hidrólisis de  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  de quinalfos en función de la concentración de NaOH a  $60 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Al igual que en el estudio realizado a  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ , observamos que la velocidad de reacción aumenta con la concentración hidróxido sódico para hacerse prácticamente constante a partir de una concentración de 1.5 M, tanto si determinamos la velocidad de reacción en el intervalo de 10 a 60 segundos, como si lo hacemos en un incremento de tiempo de 50 segundos.

Para experiencias posteriores elegimos como valor óptimo de concentración de NaOH, el de 1.5 M.

Mediante análisis logarítmico calculamos el orden de reacción parcial respecto a la concentración de hidróxido sódico.

Manteniendo constantes el resto de las variables, podemos escribir la ecuación de velocidad del siguiente modo:

$$v = K' [\text{NaOH}]^a \quad (\text{ec. I.4.})$$

Tomando logaritmos a la ecuación anterior, obtenemos la ecuación I.5, y al representar gráficamente el  $\ln v$  frente al  $\ln \text{NaOH}$  (Figuras I.16.A y I.16.B), calculamos el orden de reacción parcial respecto a la concentración de NaOH,  $a$ , en el medio de reacción.

$$\ln v = \ln K' + a \ln[\text{NaOH}] \quad (\text{ec I.5.})$$

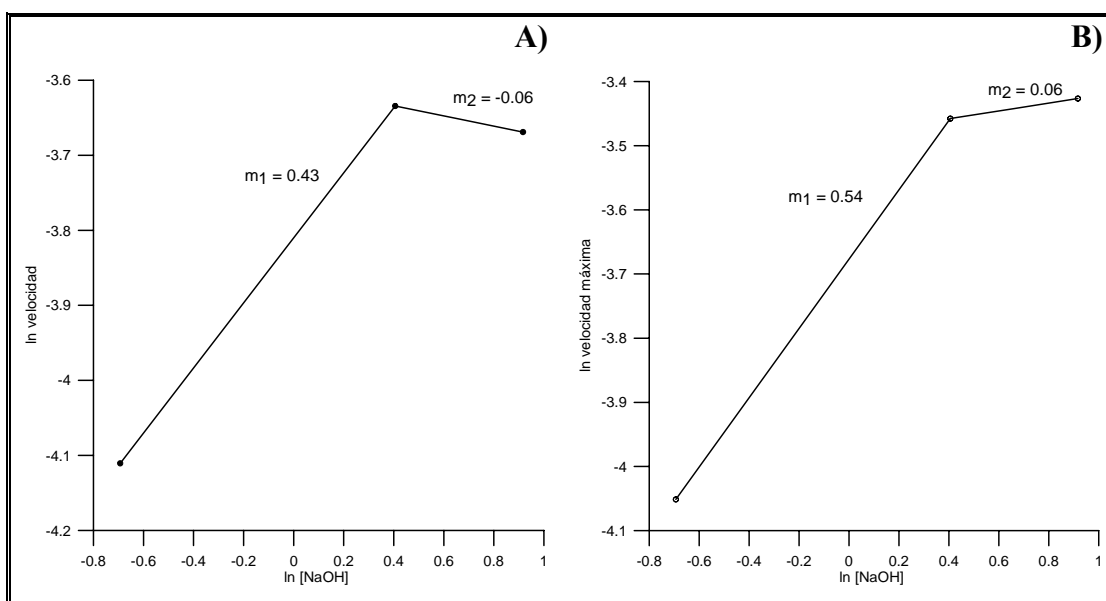


Figura I.16. Representación logarítmica de la velocidad de reacción en función de la concentración de NaOH. Velocidad determinada entre  $t_0$ : 10 y  $t_f$ : 60 seg, A) y velocidad determinada en  $\Delta t$ : 50 seg, B).

Observando las gráficas, concluimos que existen dos tramos con diferentes pendientes,  $m_1$  y  $m_2$ , por lo que tenemos dos órdenes de reacción respecto a la concentración de hidróxido sódico:

$$\begin{aligned} [\text{NaOH}] > 1.5 \text{ M} &\Rightarrow a \sim 0 \Rightarrow v = K' \\ [\text{NaOH}] < 1.5 \text{ M} &\Rightarrow a \sim 1/2 \Rightarrow v = K' [\text{NaOH}]^{1/2} \end{aligned}$$

Con la concentración de hidróxido sódico seleccionada previamente, nos aseguramos un orden de reacción 0, con lo que pequeñas variaciones en la cantidad

de hidróxido sódico no afectarán, de forma apreciable, a la velocidad de hidrólisis del quinalfos.

➤ *Influencia de la Temperatura en la cinética de hidrólisis del quinalfos*

Una vez optimizadas las variables químicas, se estudió la influencia de la temperatura en la velocidad de reacción de hidrólisis del quinalfos, registrando las curvas cinéticas entre 10 y 70 °C.

Al igual que en los ensayos anteriores, las disoluciones se prepararon directamente en la cubeta de medida, que contenía 2 µg mL<sup>-1</sup> de quinalfos, NaOH 1.5 M y 5 % de etanol. Las condiciones fijadas en el espectrofluorímetro fueron las mismas que en experiencias anteriores.

Las curvas cinéticas registradas a las diferentes temperaturas se recogen en la Figura I.17.

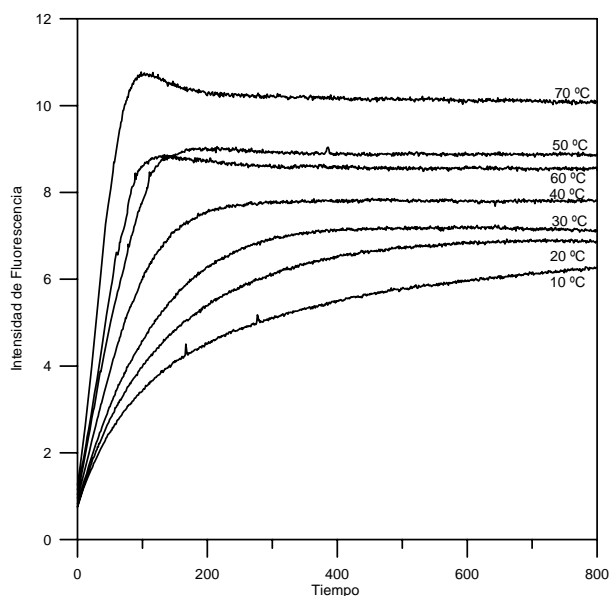


Figura I.17. Curvas cinéticas de la hidrólisis del quinalfos obtenidas a distintas temperaturas.

En la Tabla I.7 y en la Figura I.18, se muestra la variación de la velocidad de reacción de hidrólisis del quinalfos en función de la temperatura.

Tabla I.7. Velocidad de reacción en función de la temperatura.

Temperatura, °C	Velocidad ( $t_0$ : 10, $t_f$ : 60) ( $s^{-1}$ )	Velocidad máxima ( $\Delta t$ : 50) ( $s^{-1}$ )
10	0.0303	0.0341
20	0.0362	0.0397
30	0.0422	0.0448
40	0.0579	0.0591
50	0.0774	0.0792
60	0.0947	0.0950
70	0.1393	0.1415

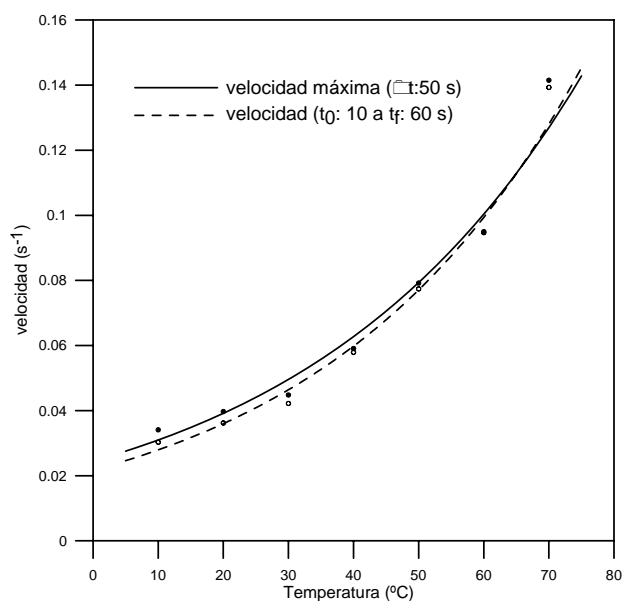


Figura I.18. Influencia de la temperatura en la cinética de hidrólisis del quinalfos.

En la Figura I.18 observamos que la velocidad de reacción aumenta exponencialmente con la temperatura, independientemente del modo que elijamos para determinar la velocidad de reacción, pues no encontramos diferencias significativas en la forma de las curvas anteriores.



Como temperatura de trabajo elegimos 60 °C ya que, por encima de esta temperatura, las curvas cinéticas que obtenemos presentan mucho ruido, probablemente debido a la formación de burbujas que origina el etanol y a que, a esta temperatura, la concentración de hidróxido sódico seleccionada anteriormente no influye en la velocidad de reacción.

➤ *Influencia del orden de adición*

Para realizar este estudio, preparamos las disoluciones directamente en la cubeta de ensayo, variando el orden de adición de los reactivos: quinalfos (2 µg mL<sup>-1</sup>), etanol (5 %) e hidróxido sódico (1.5 M). En todos los casos el etanol se añadió antes que el quinalfos. Los ensayos realizados se recogen en la Tabla I.8.

Las condiciones fijadas en el espectrofluorímetro fueron las mismas que en los ensayos anteriores. La temperatura se fijó en 60 °C.

*Tabla I.8. Ensayos realizados variando el orden de adición de los reactivos en la cubeta de medida.*

Orden de adición	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 4	Ensayo 5	Ensayo 6
1°	NaOH	NaOH	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	EtOH Quinalfos	EtOH Quinalfos
2°	H <sub>2</sub> O	EtOH Quinalfos	NaOH	EtOH Quinalfos	H <sub>2</sub> O	NaOH
3°	EtOH Quinalfos	H <sub>2</sub> O	EtOH Quinalfos	NaOH	NaOH	H <sub>2</sub> O

En los ensayos 2 y 6 las medidas de las pendientes de las curvas cinéticas serán más inexactas, ya que la reacción comenzará en el momento de mezclar el hidróxido sódico y el quinalfos, y transcurre un cierto tiempo desde esa mezcla hasta la medida, toda vez que hay que enrasar con agua antes de medir. Las curvas cinéticas obtenidas se recogen en la Figura I.19.

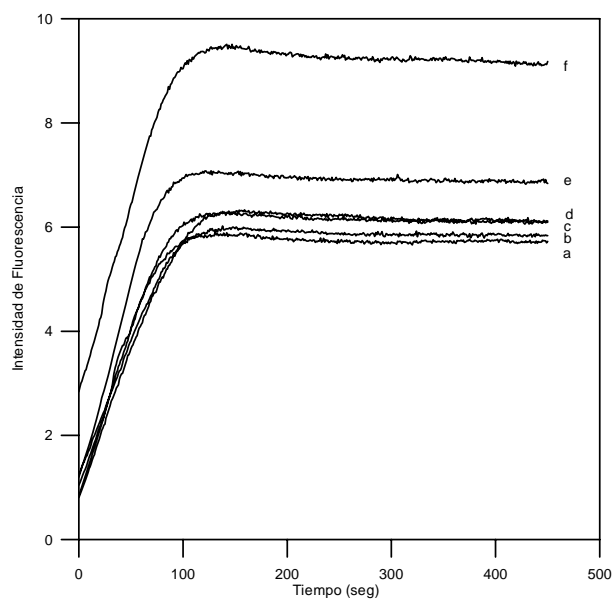


Figura I.19. Curvas cinéticas de la hidrólisis del quinalfos obtenidas variando el orden de adición del quinalfos, etanol e hidróxido sódico en la cubeta de medida. a: ensayo 1, b: ensayo 2, c: ensayo 3, d: ensayo 4, e: ensayo 5, f: ensayo 6.

Observamos en la figura anterior, el error producido en el ensayo 6, donde la reacción ha comenzado antes de comenzar a registrar la curva cinética pues, para tiempo cero, la intensidad de fluorescencia es significativamente mayor que en los demás ensayos. Este mismo error se produce también en el ensayo 2, aunque no se aprecia de modo tan significativo en la gráfica anterior. Así, observamos en la Tabla I.9 como la velocidad de reacción determinada en este ensayo es la menor.

En la Tabla I.9 representamos la influencia del orden de adición en la cinética de hidrólisis del quinalfos.

Tabla I.9. Velocidad de reacción en función del orden de adición.

Ensayo	Velocidad ( $t_0: 10, t_f: 60$ ), ( $s^{-1}$ )	Velocidad máxima ( $\Delta t: 50$ ), ( $s^{-1}$ )
Ensayo 1	0.0645	0.0650
Ensayo 2	0.0518	0.0520
Ensayo 3	0.0564	0.0582
Ensayo 4	0.0629	0.0640
Ensayo 5	0.0781	0.0784
Ensayo 6	0.0735	0.0736

Podemos decir que no existen diferencias importantes en la velocidad de reacción al variar el orden de adición de reactivos, excepto en los ensayos 2 y 6, en los que se producen errores en la determinación de la velocidad de reacción, pues transcurre un cierto tiempo entre el comienzo de la reacción y el registro de las curvas cinéticas. Debido a esto, la velocidad determinada es menor en el ensayo 2, no siendo así en el ensayo 6, esto probablemente sea debido a un aumento de la temperatura durante el transcurso de los ensayos. Por lo tanto y, tal como hicimos en los estudios anteriores, seguiremos añadiendo en último lugar el hidróxido sódico.

Una vez optimizadas las condiciones experimentales, volvemos a registrar los espectros de emisión y excitación del quinoxalin-2-ol, ya que la intensidad de fluorescencia aumenta al disminuir el porcentaje de etanol en el medio y, además, se producen ligeros desplazamientos en los máximos de emisión y excitación, como podemos observar en la Figura I.20.

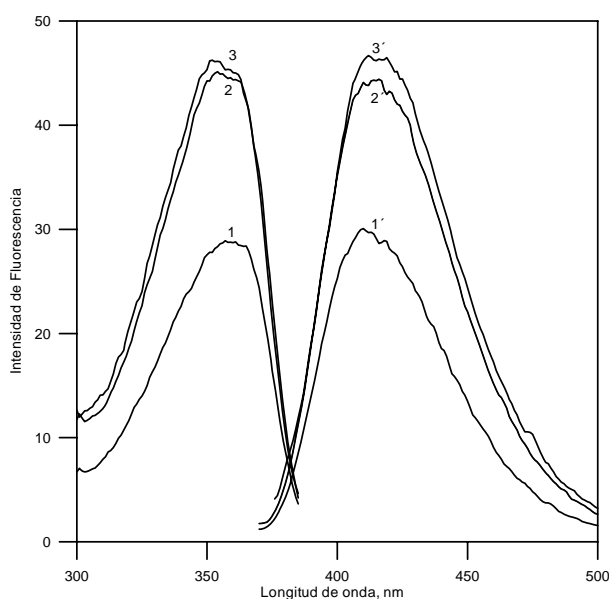


Figura I.20. Espectros de excitación y emisión del producto de hidrólisis de  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  de quinalfos en medio básico NaOH 1.5 M al 50 % (1 y 1'), 20 % (2 y 2') y 5 % de etanol (3 y 3'). Voltaje del fotomultiplicador = 750 V; Rendijas monocromadores ex/em = 4/8 nm; Velocidad de barrido = 5 nm/seg.

Los máximos de excitación y emisión del quinoxalin-2-ol se desplazan ligeramente en función del porcentaje de etanol y, para el seleccionado como óptimo, un 5%, se observa que las longitudes de onda de máxima excitación y emisión se sitúan a 353 y 418 nm, respectivamente, por lo que fijaremos los monocromadores de excitación y emisión a estas longitudes de onda para sucesivos estudios.

### ***1.2.3. Curvas de calibrado***

En primer lugar y utilizando las condiciones químicas e instrumentales óptimas indicadas en la Tabla I.10, establecimos la concentración máxima de quinalfos que podía ser determinada sin causar la saturación del detector, antes de que las curvas cinéticas se hubieran desarrollado durante un tiempo mínimo de 60 segundos, en el caso de realizar las medidas de las pendientes entre 10 y 60 segundos, o hasta un tiempo mínimo de 51 segundos, realizando las medidas de las pendientes en un incremento de tiempo de 50 segundos.

*Tabla I.10. Condiciones experimentales óptimas.*

<b>Condiciones óptimas en la cubeta de medida</b>	<b>Condiciones instrumentales óptimas</b>
[quinalfos] = variable	$\lambda_{\text{ex}} = 353 \text{ nm}$
% etanol = 5 %	$\lambda_{\text{em}} = 418 \text{ nm}$
[NaOH] = 1.5 M	Rendija ex/em = 4/8 nm
Volumen final = 3.0 mL	Voltaje = 900 V
	Temperatura = 60 °C

Las concentraciones máximas de quinalfos que podían ser determinadas bajo estas condiciones, resultaron ser  $1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$  y  $1.2 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente, por lo que construiremos las rectas de calibrado hasta estos límites.

Preparamos cada patrón por triplicado y registramos las curvas cinéticas que suavizamos utilizando el algoritmo de Savitsky-Golay.

Algunas de las curvas cinéticas obtenidas en estas condiciones se recogen en la Figura I.21 y, en la Tabla I.11, se muestran los resultados de velocidad obtenidos para cada patrón de quinalfos.

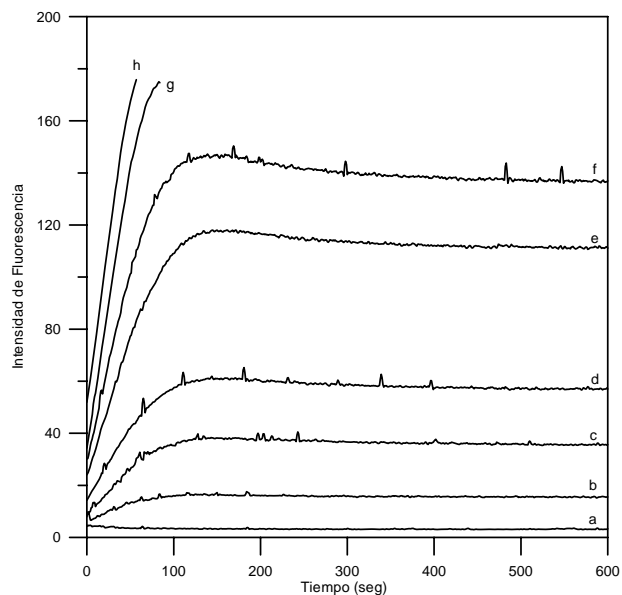


Figura I.21. Curvas cinéticas de la reacción de hidrólisis de quinalfos para patrones de distinta concentración. a:  $0 \mu\text{g mL}^{-1}$ , b:  $0.0667 \mu\text{g mL}^{-1}$ , c:  $0.167 \mu\text{g mL}^{-1}$ , d:  $0.256 \mu\text{g mL}^{-1}$ , e:  $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ , f:  $0.667 \mu\text{g mL}^{-1}$ , g:  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ , h:  $1.2 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Tabla I.11. Velocidades de reacción en función de la concentración de quinalfos.

$[\text{quin}]_{\text{cubeta}}$ $\mu\text{g mL}^{-1}$	Velocidad ( $t_0$ : 10, $t_f$ : 60) ( $\text{s}^{-1}$ )	Velocidad máxima ( $\Delta t$ : 50) ( $\text{s}^{-1}$ )
0	-0.0193	0.0075
	-0.0061	0.0009
	-0.0063	-0.0001
0.0667	0.1349	0.1478
	0.1414	0.1499
	0.1500	0.2050
0.167	0.3695	0.3765
	0.2937	0.3493
	0.2990	0.4068
0.267	0.5248	0.5569
	0.5622	0.5904
	0.5513	0.6199
0.500	1.0561	1.0773
	0.9956	1.0284
	1.0205	1.0324
0.667	1.4577	1.5074
	1.3425	1.4436
	1.2904	1.3564
1.00	2.0837	2.1804
	2.0199	2.1176
	1.9332	2.1105
1.20	-	2.4665
	-	2.4025
	-	2.5039

La curva de calibrado obtenida determinando la velocidad de reacción entre los 10 y 60 segundos se muestra en la Figura I.22 y, en la Figura I.23, se representa la curva de calibrado obtenida al determinar la velocidad máxima de reacción en un intervalo de 50 segundos. En ambas curvas se ha realizado un ajuste lineal mediante mínimos cuadrados utilizando el programa informático ACOC, desarrollado en el departamento de Química Analítica de la Universidad de Extremadura [35], cuyos parámetros estadísticos se resumen en la Tabla I.12.

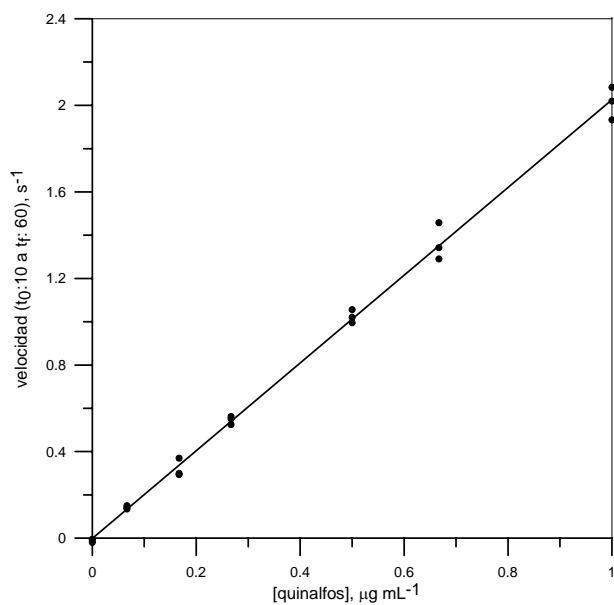


Figura I.22. Recta de calibrado para el quinalfos determinando la velocidad de reacción entre los 10 y 60 segundos. Recta de calibrado 1.

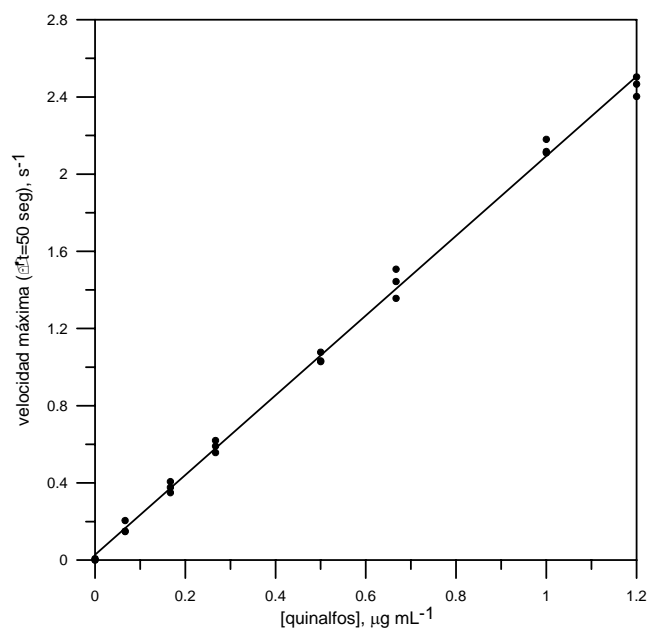


Figura I.23. Recta de calibrado para el quinalfos determinando la máxima velocidad de reacción. Recta de calibrado 2.

Tabla I.12. Parámetros estadísticos de las rectas de calibrado y parámetros analíticos de calidad.

	<b>Recta de calibrado 1</b> <b>(0.067 – 1.0 µg mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Recta de calibrado 2</b> <b>(0.067 – 1.2 µg mL<sup>-1</sup>)</b>
Ordenada Origen	-0.0016 ± 0.0143	0.030 ± 0.014
Pendiente (mL µg <sup>-1</sup> )	2.02 ± 0.03	2.07 ± 0.02
Coef. Regresión	0.999	0.999
S <sub>y/x</sub>	0.043	0.045
Linealidad	99 %	99 %
LOD Clayton <sup>[36]</sup> (α = β = 0.05) (µg mL <sup>-1</sup> )	0.050	0.050
LOD Long y Winefordner <sup>[37]</sup> (k = 3) (µg mL <sup>-1</sup> )	0.020	0.020
*Sensibilidad analítica <sup>[38]</sup> , γ <sup>-1</sup> (µg mL <sup>-1</sup> )	0.021	0.022

\*Recientemente, se ha propuesto el término de resolución analítica para este parámetro, dado que la IUPAC indica que el término “sensibilidad” debe asociarse sola y exclusivamente con la pendiente de la recta de calibrado [39].

Los parámetros analíticos de ambas rectas son prácticamente iguales, salvo la extensión del rango de linealidad obtenida en la recta de calibrado 2. No obstante, en el apartado I.4.1 del presente capítulo, realizaremos el test de confianza de la pendiente y la ordenada en el origen, con objeto de comparar los resultados obtenidos al medir las pendientes en los dos modos anteriormente descritos.

El análisis logarítmico de ambas rectas de calibrado, Figuras I.24.A y I.24.B, ofrece una única zona cinética de pendiente aproximadamente 1, por lo que podemos decir que, con respecto a la concentración de quinalfos, el orden parcial de la reacción es 1.



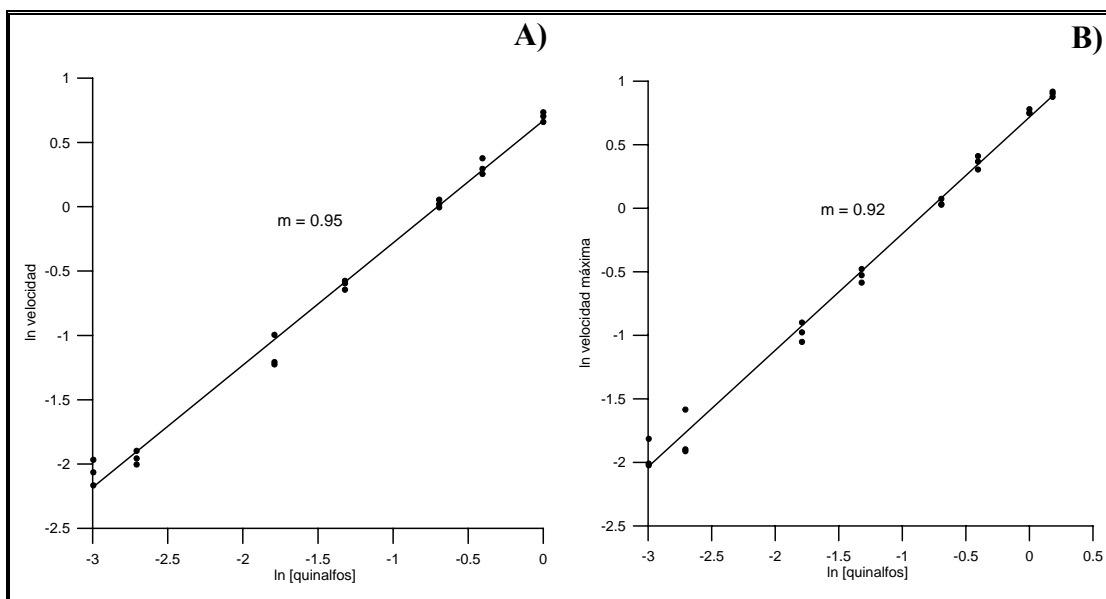


Figura 1.24. Representación logarítmica de la influencia de la concentración de quinalfos sobre la velocidad de reacción. Velocidad determinada entre  $t_0$ : 10 y  $t_f$ : 60 seg, A) y velocidad determinada en  $\Delta t$ : 50 seg, B).

Este resultado, junto con los obtenidos al estudiar la influencia de la concentración de hidróxido sódico y del porcentaje de etanol, permite establecer, a 60 °C y para concentración de NaOH >1.5 M y EtOH < 15 %, la siguiente ecuación cinética.

$$v \text{ (s}^{-1}\text{)} = K [\text{quinalfos}] \quad (\text{ec. I.6.})$$

➤ *Cálculo de la energía de activación*

Según la ecuación de Arrhenius, la relación entre la constante de velocidad,  $K$ , y la temperatura,  $T$ , viene dada por:

$$K = A e^{-E_a/RT} \quad (\text{ec. I.7.})$$

donde  $A$  es un factor de proporcionalidad,  $R$  la constante de los gases perfectos y  $E_a$  la energía de activación.

Podemos relacionar  $\ln K$  con la temperatura a través de la siguiente expresión:

$$\ln K = \ln A - \frac{E_a}{RT} \quad (\text{ec. I.8.})$$

Ajustando la expresión anterior a una recta podemos obtener la pendiente  $-E_a/R$ , lo que nos permitirá determinar la energía de activación.

En la Figura I.25.A) y I.25.B) se ha representado  $\ln K$  frente a  $1/T$ , donde  $K$  se ha calculado a partir de la ecuación I.6, teniendo en cuenta que la concentración de quinalfos es  $6.70 \times 10^{-6}$  M.

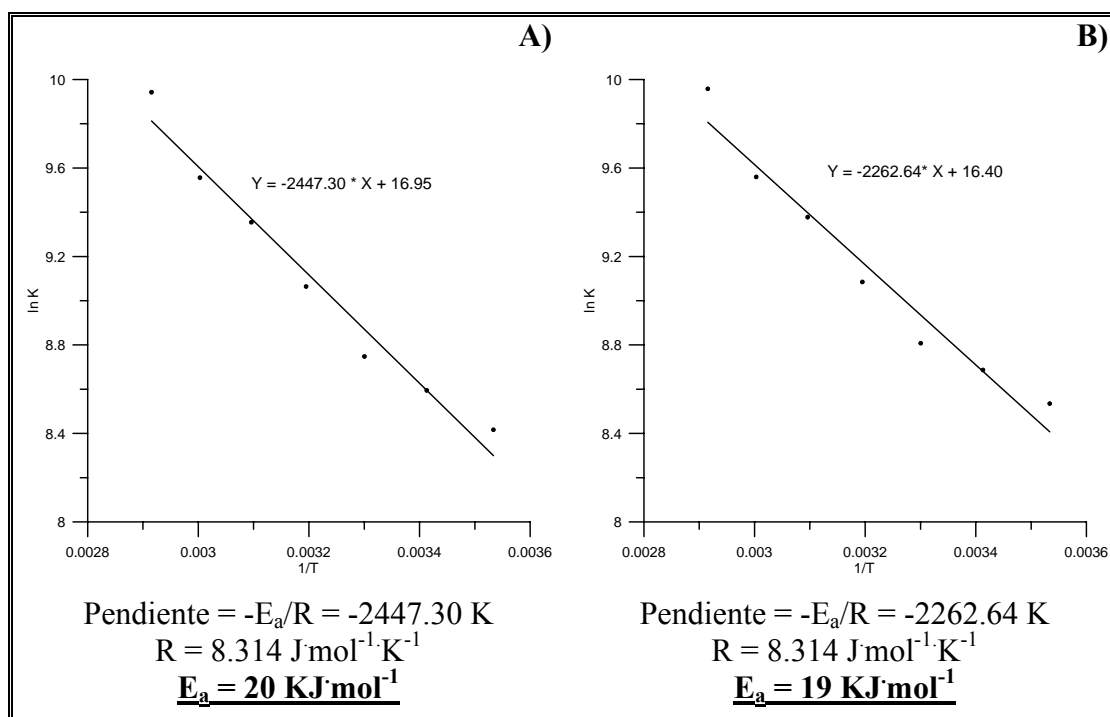


Figura I.25. Cálculo de la energía de activación de la reacción de hidrólisis de quinalfos.  $[\text{quinalfos}] = 6.7 \times 10^{-6}$  M. Velocidad determinada entre  $t_0$ : 10 y  $t_f$ : 60 seg, A) y velocidad determinada en  $\Delta t$ : 50 seg, B).

#### 1.2.4. Estudio de la precisión

Se realiza el estudio de la precisión de los dos métodos propuestos preparando réplicas ( $n = 10$ ) de dos disoluciones patrón de quinalfos, de concentraciones  $0.20$  y  $0.87 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente, en la cubeta de medida. Se registraron las correspondientes curvas cinéticas bajo las condiciones químicas e instrumentales indicadas en la Tabla I.10. y se midieron las pendientes.

Los valores de velocidad obtenidos, así como las concentraciones de quinalfos estimadas a partir de las rectas de calibrado 1 y 2, para cada una de las concentraciones ensayadas, se detallan en la Tabla I.13 y Tabla I.14.

Tabla I.13. Concentraciones predichas con la recta de calibrado 1.

<b>[quinalfos]<sub>teórica</sub> = 0.20 <math>\mu\text{g mL}^{-1}</math></b>			<b>[quinalfos]<sub>teórica</sub> = 0.87 <math>\mu\text{g mL}^{-1}</math></b>		
Muestra	Velocidad ( $t_0:10$ a $t_f:60$ ) ( $\text{s}^{-1}$ )	[quinalfos] <sub>calculada</sub> ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Muestra	Velocidad ( $t_0:10$ a $t_f:60$ ) ( $\text{s}^{-1}$ )	[quinalfos] <sub>calculada</sub> ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
1	0.5264	0.2583	1	1.7402	0.8596
2	0.4223	0.2068	2	1.7014	0.8404
3	0.5227	0.2565	3	1.7464	0.8627
4	0.4708	0.2308	4	1.7342	0.8567
5	0.4428	0.2169	5	1.9023	0.9399
6	0.4518	0.2214	6	1.7260	0.8526
7	0.4341	0.2126	7	1.9449	0.9610
8	0.4577	0.2243	8	1.8961	0.9369
9	0.4210	0.2061	9	1.9603	0.9687
10	0.4695	0.2301	10	1.9301	0.9537
Valor medio $\pm$ SD		<b>0.23 <math>\pm</math> 0.02</b>	Valor medio $\pm$ SD		<b>0.90 <math>\pm</math> 0.05</b>
RSD (%)		8.7	RSD (%)		5.5
Varianza, $s^2$		0.00034	Varianza, $s^2$		0.00276

Tabla I.14. Concentraciones predichas con la recta de calibrado 2.

<b>[quinalfos]<sub>teórica</sub> = 0.20 µg mL<sup>-1</sup></b>			<b>[quinalfos]<sub>teórica</sub> = 0.87 µg mL<sup>-1</sup></b>		
Muestra	Velocidad máxima (Δt: 50) (s <sup>-1</sup> )	[quinalfos] <sub>calculada</sub> (µg mL <sup>-1</sup> )	Muestra	Velocidad máxima (Δt: 50) (s <sup>-1</sup> )	[quinalfos] <sub>calculada</sub> (µg mL <sup>-1</sup> )
1	0.5303	0.2423	1	1.7524	0.8348
2	0.4544	0.2055	2	1.7279	0.8229
3	0.5315	0.2429	3	1.7538	0.8355
4	0.4732	0.2146	4	1.7548	0.8360
5	0.4960	0.2257	5	1.9839	0.9470
6	0.4714	0.2137	6	1.7271	0.8225
7	0.4671	0.2117	7	2.0706	0.9891
8	0.4894	0.2225	8	1.9457	0.9285
9	0.4491	0.2029	9	1.9603	0.9356
10	0.4729	0.2145	10	1.9518	0.9315
Valor medio ± SD		<b>0.22 ± 0.01</b>	Valor medio ± SD		<b>0.89 ± 0.06</b>
RSD (%)		4.5	RSD (%)		6.7
Varianza, s <sup>2</sup>		0.00019	Varianza, s <sup>2</sup>		0.00403

Como observamos en las tablas anteriores, las predicciones realizadas con la recta de calibrado 2 son ligeramente más exactas para los dos valores de concentración ensayados. No obstante, la precisión de las estimaciones es bastante aceptable con ambas rectas.

También se estudió la precisión de las medidas en días diferentes utilizando las dos curvas de calibración. Para ello, se registró diariamente (n = 6) la curva cinética de una disolución de quinalfos que contenía, en la cubeta de medida: 0.5 µg mL<sup>-1</sup> de quinalfos, 5 % de etanol y NaOH 1.5 M. En la Tabla I.15 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla I.15. Estudio de la precisión realizado en 6 jornadas diferentes.

<b>[quinalfos]<sub>teórica</sub> = 0.50 µg mL<sup>-1</sup></b>					
Recta de calibrado 1			Recta de calibrado 2		
Muestra	Velocidad (t <sub>0</sub> :10 a t <sub>f</sub> :60) (s <sup>-1</sup> )	[quinalfos] <sub>calculada</sub> (µg mL <sup>-1</sup> )	Muestra	Velocidad máxima (Δt: 50) (s <sup>-1</sup> )	[quinalfos] <sub>calculada</sub> (µg mL <sup>-1</sup> )
Día 1	1.0561	0.5207	Día 1	1.0773	0.5075
Día 2	1.0205	0.5031	Día 2	1.0324	0.4857
Día 3	1.0345	0.5100	Día 3	1.0703	0.5041
Día 4	0.9937	0.4898	Día 4	1.0180	0.4787
Día 5	1.0802	0.5327	Día 5	1.0896	0.5135
Día 6	1.0432	0.5143	Día 6	1.1904	0.5623
Valor medio ± SD		<b>0.51 ± 0.01</b>	Valor medio ± SD		<b>0.51 ± 0.03</b>
RSD (%)		2.0	RSD (%)		5.9
s <sup>2</sup>		0.00022	s <sup>2</sup>		0.00084

Se realizó un estudio estadístico para determinar si una población era más variable que otra (medidas realizadas el mismo día y distintos días). Para ello, se realiza una comparación de las varianzas mediante el test F de Fisher [40, 41], calculándose la relación:

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} \quad (\text{ec. I.9.})$$

de tal forma que aquella de las dos varianzas  $s_1^2$  ó  $s_2^2$  que sea mayor se sitúa en el numerador. Esta relación calculada se compara con el valor tabulado para el nivel de significancia,  $\alpha$ , elegido y los grados de libertad  $n_1-1$  y  $n_2-1$ , correspondientes al numerador y al denominador, respectivamente. Si  $F_{\text{cal}}$  es mayor que  $F_{\text{tab}}$  se concluye que existe una diferencia estadísticamente significativa entre las varianzas de los dos conjuntos de datos.

En la Tabla I.16 se indican los valores de varianza obtenidos en los distintos ensayos con las dos rectas de calibrado y, en la Tabla I.17, se muestran los valores de  $F_{\text{cal}}$  y  $F_{\text{tab}}$  obtenidos para ambas rectas de calibrado y valores de concentración ensayados.

Tabla I.16. Varianza.

	[quinalfos]	$s_i^2$	
	$\mu\text{g mL}^{-1}$	Calibración 1	Calibración 2
Ensayos realizados mismo día	C <sub>1</sub> : 0.20	0.00034	0.00019
	C <sub>2</sub> : 0.87	0.00276	0.00403
Ensayos realizados distintos días	C <sub>3</sub> : 0.50	0.00022	0.00084

Tabla I.17. Resultados del test de Fisher.

	$F_{\text{cal}}$	$F_{\text{tab}}$	
C <sub>1</sub> , C <sub>3</sub> , recta 1	<b>1.54</b>	$F_{\text{tab}}(0.05, 9, 5)$ : <b>4.77</b>	No difieren significativamente
C <sub>1</sub> , C <sub>3</sub> , recta 2	<b>4.58</b>	$F_{\text{tab}}(0.05, 5, 9)$ : <b>3.48</b>	Difieren significativamente
C <sub>2</sub> , C <sub>3</sub> , recta 1	<b>12.5</b>	$F_{\text{tab}}(0.05, 9, 5)$ : <b>4.77</b>	Difieren significativamente
C <sub>2</sub> , C <sub>3</sub> , recta 2	<b>4.79</b>	$F_{\text{tab}}(0.05, 9, 5)$ : <b>4.77</b>	Difieren significativamente

De acuerdo con el test de Fisher, excepto en el caso del ensayo realizado con la menor concentración (C<sub>1</sub>) y la recta de calibrado 1, sí existen diferencias estadísticamente significativas en los resultados de la repetitividad para el quinalfos. Esto puede ser debido a que la dispersión de los resultados en un mismo día es mayor que para distintos días, pues trabajando a temperatura tan elevada es difícil mantener perfectamente termostatada la cubeta del espectrofluorímetro, por lo que un ligero incremento de la temperatura durante la realización de los ensayos originará un aumento grande de la velocidad de reacción y, como podemos observar, este efecto es más acusado cuanto mayor es la concentración de quinalfos.

### ***1.2.5. Estudio de la selectividad del método propuesto***

La selectividad del método propuesto se estudió por adición de otros pesticidas organofosforados, tales como metil-paratión, etil-paratión, fenitrotión, metidatión y clorpirifos, a una disolución de quinalfos preparada en las mismas condiciones experimentales que los patrones de calibrado. También se estudió la simazina, herbicida perteneciente a la familia de las triazinas, muy utilizado en el cultivo de cítricos y vid.

Al igual que el quinalfos, estos pesticidas sufren hidrólisis en condiciones adecuadas de pH y temperatura [1] y, algunos de ellos, aparecen junto al quinalfos en formulaciones comerciales y en cítricos [16].

Se prepararon disoluciones de los pesticidas en etanol, excepto de metidatión que se preparó en agua. Las disoluciones se prepararon directamente en la cubeta de ensayo, manteniendo fija la concentración de quinalfos y adicionando volúmenes variables de los pesticidas en estudio, obteniendo distintas relaciones quinalfos:interferente y manteniendo en todos los casos un 5 % de etanol y una concentración de NaOH 1.5 M. Se registraron las curvas cinéticas correspondientes y se midieron las pendientes y, haciendo uso de las rectas de calibrado 1 y 2, se calcularon las concentraciones de quinalfos.

En la Tabla I.18 se muestran las recuperaciones de quinalfos en presencia de los distintos pesticidas ensayados y a las mayores proporciones a las que no se observaron interferencias.

*Tabla I.18. Estudio de interferencias.*

<b>Interferente</b>	<b>Interferente : Quinalfos (masa : masa)</b>	<b>Recuperación (%)</b>	
		Recta de calibrado 1	Recta de calibrado 2
METIL-PARATION	5 : 1	96	99
ETIL-PARATION	5 : 1	98	101
FENITROTION	5 : 1	94	92
CLORPIRIFOS	5 : 1	94	100

En el caso del metidatión y la simazina, se comprobó que no interferían en la determinación cinética de quinalfos en todo el rango estudiado (de interferente:quinalfos 1:1 a 100:1), obteniéndose porcentajes de recuperación en todos los casos entre el 90 y 110 %.

Se comprobó que metil-paratión, etil-paratión, fenitrotión y clorpirifos no interferían en la determinación cinética de quinalfos en, al menos, una relación 5:1.



### **I.3. DETERMINACIÓN CINÉTICA DE QUINALFOS EN MODO FLUJO DETENIDO**

Una de las mayores objeciones que se ha mencionado con respecto al uso de los sistemas cinéticos de determinación, es la necesidad de mezclar los reactivos en cierto orden, en forma reproducible y con control de la temperatura; es decir, bajo condiciones experimentales cuidadosamente controladas. La manipulación de la muestra, así como la adición de reactivos, puede hacerse más convenientemente utilizando un módulo de mezcla (stopped-flow) que, sobre todo en el caso de reacciones rápidas, da buenos resultados. En el presente apartado de este capítulo desarrollaremos un método cinético para la determinación de quinalfos utilizando un reactor de flujo detenido (stopped-flow).

#### ***I.3.1. Procedimiento de trabajo. Optimización de las variables químicas***

Para poder controlar y reproducir el instante en el que se produce la mezcla de los reactivos, se utilizó un reactor de flujo detenido Milliflow, en el cual, el reactor propiamente dicho es la cubeta de medida, hecho que permite el estudio de una reacción química desde su etapa inicial, ya que el sistema electrónico del equipo permite el registro de intensidades de fluorescencia justo en el instante en el que se produce la mezcla en la cubeta de medida.

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 del bloque de parada, una válvula para cerrar las jeringas de impulsión y otra válvula que permite el vaciado y limpieza de la celda de medida (Figura I.26 y I.27). Este reactor está diseñado de forma que todo el aparato pueda ser termostatado de 10 a 45 °C con un baño de agua.

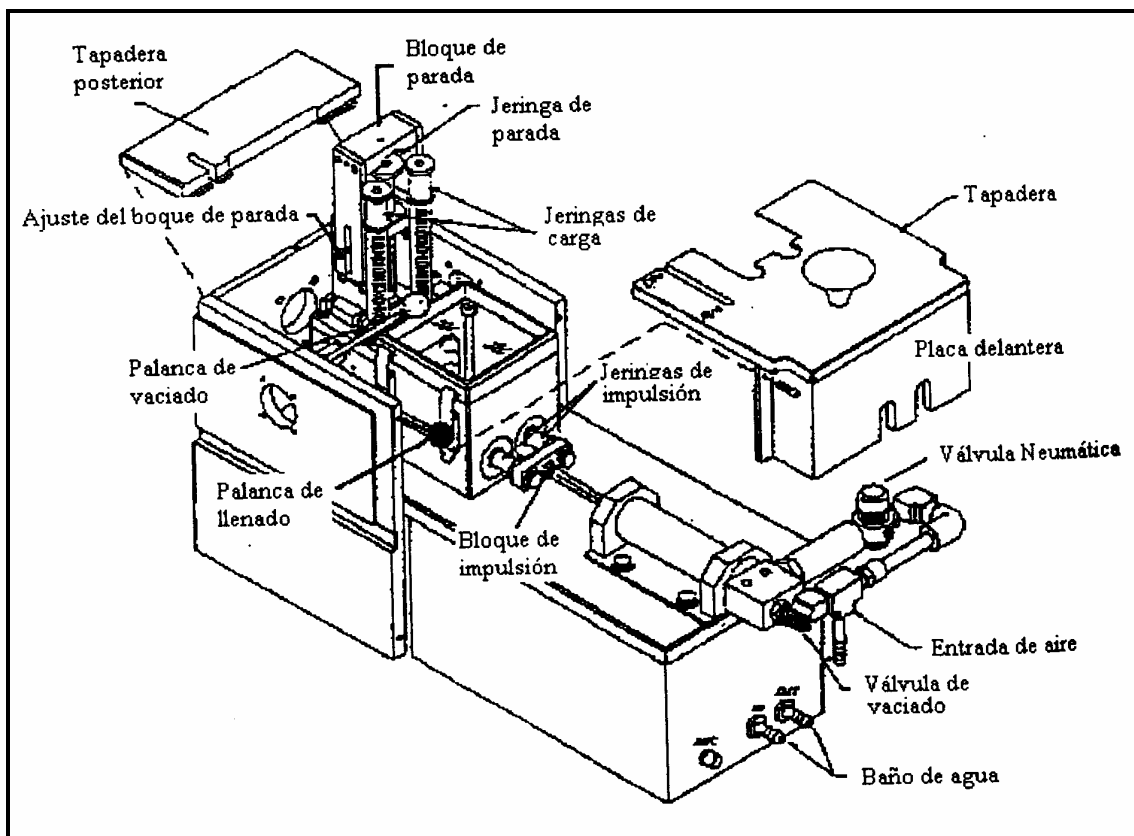


Figura I.26. Reactor de flujo parado: Milliflow Stopped Flow Reactor.

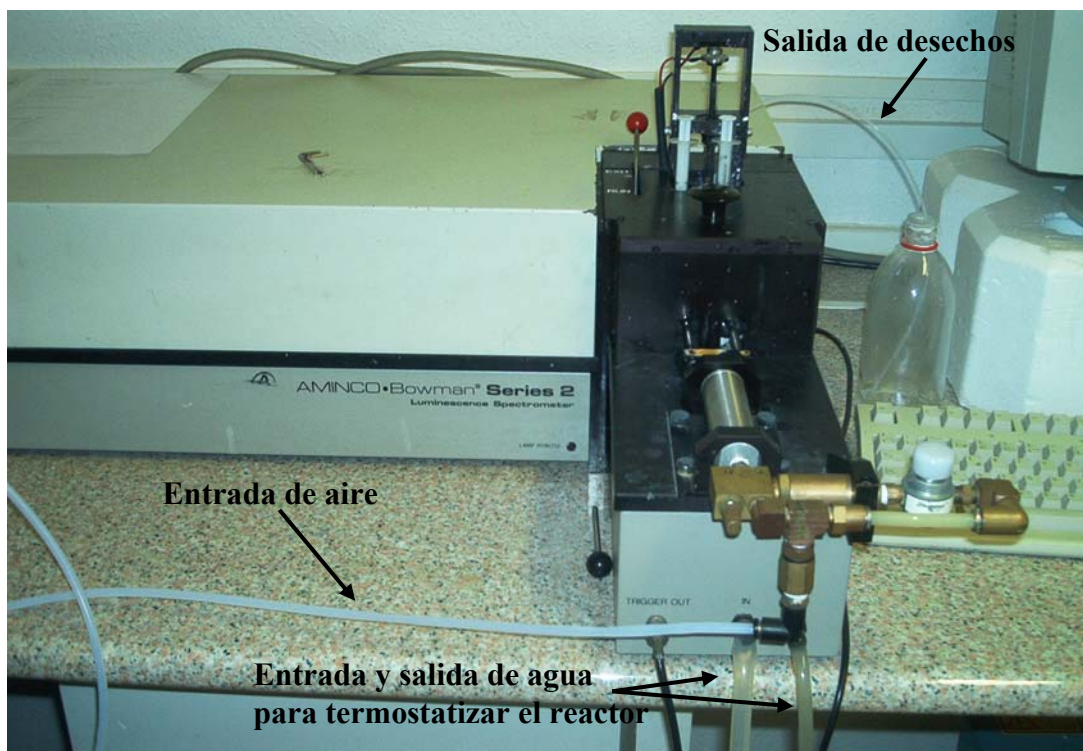


Figura I.27. Fotografía del Reactor de flujo parado.

La forma de operar en el reactor de flujo detenido es como se explica a continuación: se llenan las jeringas de carga con los reactivos, se ajustan las exclusas que se encuentran en la parte superior del reactor, se abre la válvula de llenado accionando la palanca hasta la posición de llenado y los reactivos se transfieren al interior de las jeringas de impulsión, llenándolas con el volumen deseado. Manualmente se presionan los émbolos de las jeringas de carga. Esta presión hace que las disoluciones de las jeringas de carga llenen las jeringas de impulsión, que se encuentran termostatadas. El llenado de las jeringas de impulsión continúa hasta que el bloque se haya retraído completamente. Asegurándose de que la palanca de la válvula de vaciado permanece en la posición de funcionamiento, se cierra la válvula de llenado moviendo la palanca 90° hasta alcanzar la posición de funcionamiento. Cuando la palanca se encuentra en esta posición se quita la válvula.

Para registrar los datos en el espectrómetro de luminiscencia se lanza el programa que ejecuta la aplicación que se quiera realizar y, entonces, se activa neumáticamente el bloque de impulsión. Una medida muy importante consiste en asegurarse que las jeringas de impulsión están perfectamente conectadas al bloque de impulsión antes de la activación neumática. La impulsión que se produce fuerza que una cantidad de los reactivos de las jeringas de impulsión se desplace a gran velocidad a través de una cámara de mezcla situada en el interior de la celda de medida y, finalmente, a la jeringa de parada. Este volumen produce un movimiento ascendente del pistón de la jeringa de parada que se detiene según la posición en la que se encuentre el ajuste del bloque de parada. Cuando el pistón alcanza el bloque de parada, se produce un contacto eléctrico que dispara el registro de los datos por el espectrómetro de luminiscencia. Después de que se haya observado completamente la reacción, se deben expulsar de la jeringa de parada los reactivos que se han 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 la válvula poniendo su palanca en la posición de funcionamiento. En estas condiciones el reactor de flujo parado está preparado para el siguiente ensayo.

Las variables experimentales que se optimizaron fueron las mismas que en el apartado I.2.2 y la determinación de quinalfos, una vez optimizadas estas variables, se realizó en función de la cinética de hidrólisis y, por tanto, del desarrollo de la fluorescencia.

Es importante destacar que la intensidad de fluorescencia que se observa en el reactor de flujo parado es menor que la que se observa para una misma muestra cuando se mezclan los reactivos de forma manual. Esto se debe a que el camino óptico de la celda de medida del reactor de flujo parado es de 2x2 mm, mientras que el de un espectrómetro de luminiscencia convencional es de 10x10 mm. Esto obliga a aumentar el ancho de rendijas de los monocromadores al doble, 8 y 16 nm para excitación y emisión, respectivamente. Por el mismo motivo, se fijó el voltaje del

tubo fotomultiplicador en 900 V, ya que, para concentraciones diluidas de quinalfos, la señal de fluorescencia que producía el quinoxalin-2-ol, era muy débil, dificultando la medida de la pendiente de la correspondiente curva cinética. Así, el ruido instrumental cobra mayor relevancia cuando se registran tanto las curvas cinéticas como los espectros de fluorescencia utilizando el reactor de flujo parado. Por tanto, en cada una de las curvas cinéticas que se registren con el reactor de flujo parado, se calcula la curva media resultante de dos réplicas (dos inyecciones con la misma carga) y se suaviza utilizando el algoritmo de Savitsky-Golay.

Se registraron las correspondientes curvas cinéticas entre tiempo cero, momento en que se mezclan los reactivos con la impulsión neumática, hasta los 900 segundos, con una resolución de 1 segundo.

Al igual que procedimos en los ensayos descritos en el apartado I.2, con ayuda del programa informático ESCIN, optimizamos un intervalo de tiempo en el cual medir las pendientes de las curvas cinéticas. Además, determinamos la pendiente máxima de cada curva cinética.

En algunos de los ensayos realizados, la lámpara del espectrofluorímetro se saturaba al registrar las curvas cinéticas antes de los 50 segundos, por lo que utilizar un incremento de tiempo de 50 segundos, como se optimizó en el apartado anterior, no fue viable. Utilizar un voltaje más bajo del tubo fotomultiplicador tampoco fue posible, pues, como explicamos anteriormente, se dificultaba la medida de las pendientes de las curvas cinéticas obtenidas para bajas concentraciones de quinalfos. Así, seleccionamos como intervalo óptimo para medir las pendientes de las curvas cinéticas, el comprendido entre los 10 y 20 segundos y, determinaremos la pendiente máxima de cada curva cinética utilizando también un intervalo de 10 segundos, que se corresponde con 11 puntos experimentales.

Las variables experimentales optimizadas fueron, al igual que en el capítulo anterior, la temperatura, el porcentaje de etanol y la concentración de hidróxido sódico.

➤ *Influencia de la temperatura*

El reactor de flujo parado MilliFlow está diseñado de forma que puede ser termostataado de 10 a 45 °C mediante un baño de agua. No se deben realizar variaciones bruscas de temperatura, ni salirse del rango anterior, ya que se podrían dilatar y contraer las gomas y las juntas de los distintos componentes del reactor, dando lugar a pérdidas de reproducibilidad en la señal analítica.

Al realizar este estudio, encontramos que la velocidad de reacción aumenta a medida que lo hace la temperatura pero, para temperaturas superiores a 25 °C, las curvas cinéticas registradas presentaban mucho ruido, por lo que al calcular las pendientes de dichas curvas, el coeficiente de ajuste de regresión lineal que obteníamos era muy bajo y, además, obteníamos muy poca reproducibilidad de la señal analítica. Por lo tanto, seleccionamos 25 °C como temperatura óptima de trabajo con el reactor de flujo parado.

➤ *Influencia del porcentaje de etanol*

Preparamos las disoluciones de las jeringas de carga del siguiente modo: disolución de quinalfos de  $0.56 \mu\text{g mL}^{-1}$ , variando el porcentaje de etanol entre el 5 y 50 % (jeringa de carga 1) y disolución de hidróxido sódico 3.0 M (jeringa de carga 2). Teniendo en cuenta que las disoluciones se diluirán al 50 % en la celda de medida, las concentraciones resultantes en ésta serán de  $0.28 \mu\text{g mL}^{-1}$  de quinalfos, con etanol entre el 2.5 y 25 %, e hidróxido sódico 1.5 M.

Las curvas cinéticas registradas se muestran en la Figura I.28.

En la Tabla I.19 y en la Figura I.29, se muestra la variación de la velocidad de reacción de hidrólisis de quinalfos en función del porcentaje de etanol.

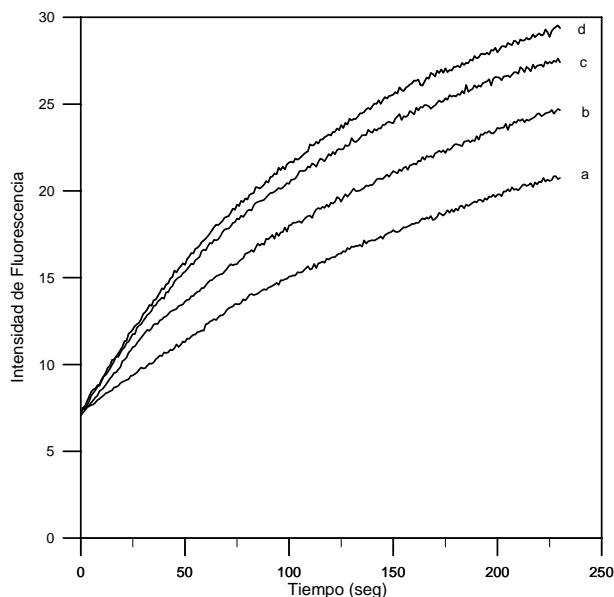


Figura I.28. Curvas cinéticas de la hidrólisis de quinalfos obtenidas variando el porcentaje de etanol, a: 25%, b: 10%, c: 5%, d: 2.5%. [Quinalfos]:  $0.28 \mu\text{g mL}^{-1}$ ; [NaOH]: 1.5 M.

Tabla I.19. Velocidad de reacción en función del porcentaje de etanol.

Etanol en cubeta (%)	Velocidad ( $t_0: 10, t_f: 20$ ) ( $\text{s}^{-1}$ )	Velocidad máxima ( $\Delta t: 10$ ) ( $\text{s}^{-1}$ )
2.5	0.1850	0.1968
5	0.1796	0.1843
10	0.1383	0.1558
25	0.0860	0.1012

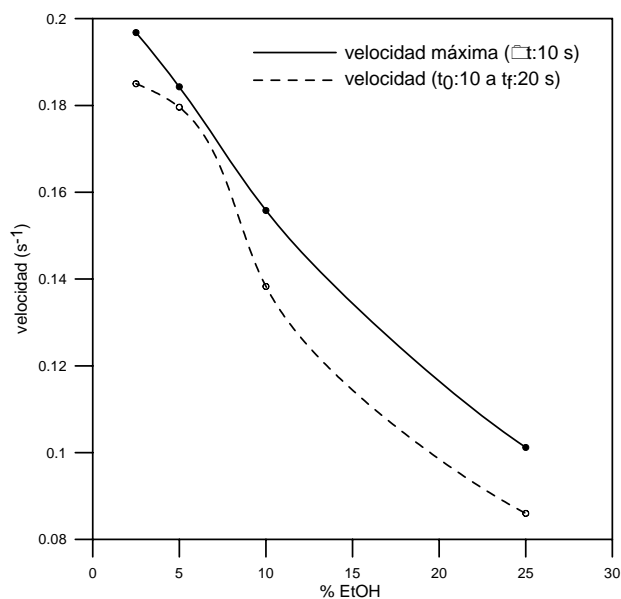


Figura I.29. Influencia del porcentaje de etanol en la velocidad de hidrólisis del quinalfos.

En la Figura I.29 observamos la misma tendencia, tanto si determinamos la velocidad máxima de reacción como la velocidad entre los 10 y los 20 segundos, y llegamos a la misma conclusión que en el apartado anterior, la cinética de hidrólisis de quinalfos se ve desfavorecida con la presencia de etanol en el medio de reacción. Por ello, utilizaremos el mínimo porcentaje de etanol posible, en este caso, debido a la dilución que se realiza en la cubeta de medida, será del 2.5 %.

➤ *Influencia de la concentración de hidróxido sódico*

Las disoluciones de las jeringas de carga se prepararon de la siguiente manera: disolución acuosa de quinalfos  $0.56 \mu\text{g mL}^{-1}$ , 5 % etanol (jeringa de carga 1) y disoluciones de concentración variable de hidróxido sódico comprendidas entre 0 y 6 M (jeringa de carga 2). Teniendo en cuenta la dilución en la celda de medida, las concentraciones resultantes en ésta serán de  $0.28 \mu\text{g mL}^{-1}$  de quinalfos, 2.5 % etanol e hidróxido sódico comprendido entre 0 y 3 M.

Las curvas cinéticas registradas se muestran en la Figura I.30.



En la Tabla I.20 y en la Figura I.31, se representan la variación de la velocidad de reacción de hidrólisis de quinalfos en función de la concentración de hidróxido sódico.

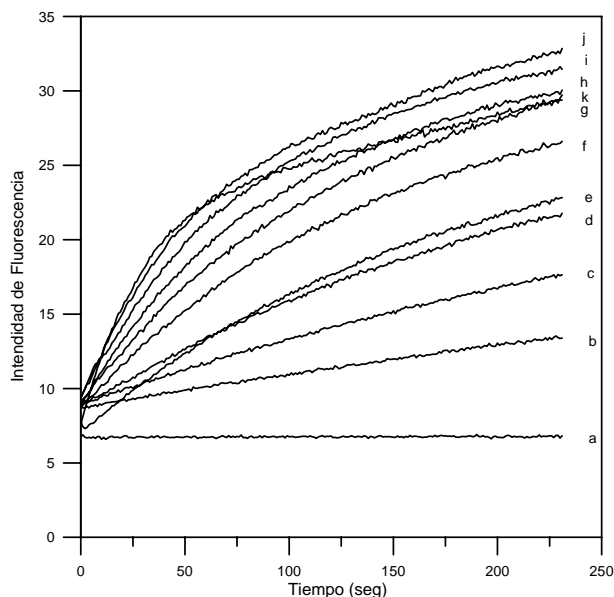


Figura I.30. Curvas cinéticas de la reacción de hidrólisis del quinalfos en función de la concentración de NaOH. [Quinalfos]:  $0.28 \mu\text{g mL}^{-1}$ ; Etanol 2.5 %. a: 0 M NaOH, b: 0.25 M NaOH, c: 0.5 M NaOH, d: 0.75 M NaOH, e: 1 M NaOH, f: 1.25 M NaOH, g: 1.5 M NaOH, h: 1.75 M NaOH, i: 2 M NaOH, j: 2.5 M NaOH, k: 3 M NaOH.

Tabla I.20. Velocidad de reacción en función de la concentración de NaOH.

[NaOH] <sub>cubeta</sub> , M	Velocidad ( $t_0$ : 10, $t_f$ : 20) ( $\text{s}^{-1}$ )	Velocidad máxima ( $\Delta t$ : 10) ( $\text{s}^{-1}$ )
0	0.0021	0.0038
0.25	0.0279	0.0285
0.50	0.0483	0.0545
0.75	0.0856	0.0856
1.00	0.1116	0.1223
1.25	0.1424	0.1493
1.50	0.1548	0.1855
1.75	0.2098	0.2211
2.00	0.2183	0.2571
2.50	0.2803	0.3036
3.00	0.3535	0.4642

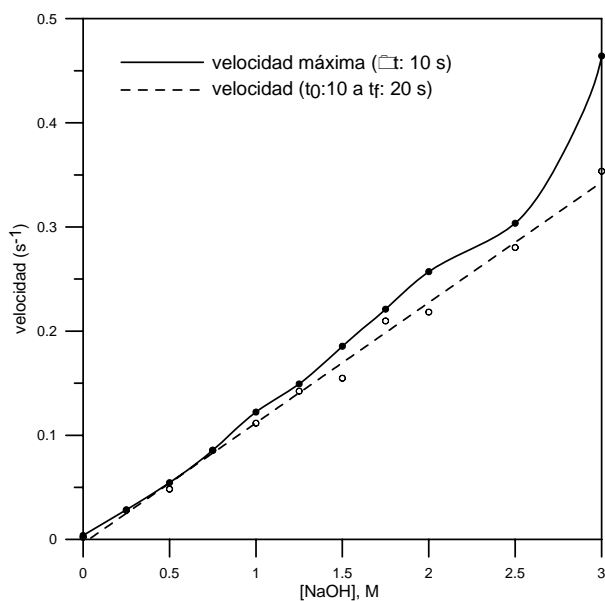


Figura I.31. Variación de la velocidad de reacción de hidrólisis del quinalfos en función de la concentración de NaOH.

Se observa que la velocidad de reacción de hidrólisis del quinalfos aumenta con la concentración de hidróxido sódico en todo el intervalo estudiado.

En el apartado anterior concluimos que la cinética de hidrólisis aumentaba con la concentración de NaOH, hasta un valor en que esta relación se hacía prácticamente independiente. Este valor dependía de la temperatura de trabajo, cuánto mayor era la temperatura, menor era este valor de concentración.

Estudiamos la relación entre la concentración de NaOH y la velocidad de reacción a distintas temperaturas, Figura I.32, teniendo en cuenta que con el reactor de flujo parado no debemos superar los 45 °C y que, para temperaturas superiores a 25 °C, la reproducibilidad de la señal analítica es muy baja, debido al ruido instrumental.

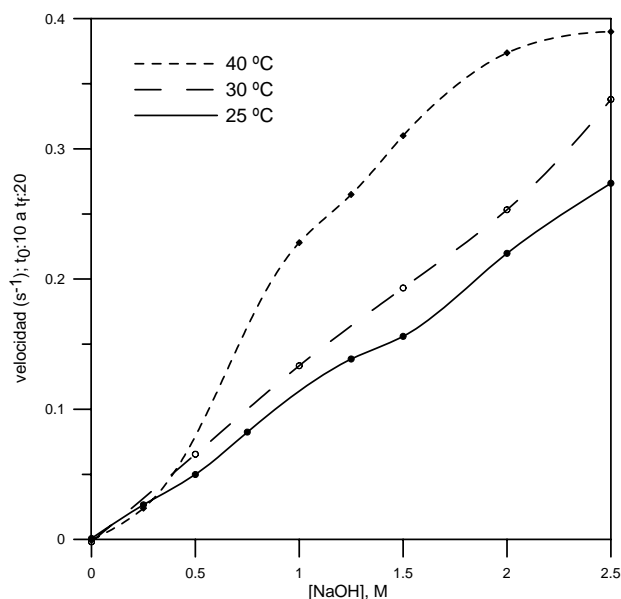


Figura I.32. Variación de la velocidad de reacción de hidrólisis del quinalfos en función de la concentración de NaOH a distintas temperaturas. [quinalfos]:  $0.28 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

En la figura anterior se observa que a 25 y 30 °C, la velocidad de reacción aumenta con la concentración de NaOH en todo el rango estudiado, mientras que a 40 °C, esta relación se hace más independiente a partir de 2 M de hidróxido sódico, tal y como concluimos en el apartado anterior. Esta tendencia se repite si representamos la velocidad de reacción máxima frente a la concentración de NaOH.

Como explicamos anteriormente, seleccionamos 25 °C como temperatura óptima de trabajo con el reactor de flujo parado. A esta temperatura, necesitaríamos trabajar con NaOH muy concentrado, para que no influyera en la velocidad de reacción. No obstante, seleccionamos como concentración de hidróxido sódico 1.5 M, es decir, 3 M en la jeringa de carga, ya que disoluciones de NaOH más concentradas podrían atacar a algún componente del reactor de flujo parado. Además, se podrían producir procesos de descomposición de nuestro producto.

Con la concentración de hidróxido sódico seleccionada deberemos tener especial cuidado, ya que pequeñas variaciones en la cantidad añadida afectarán de forma apreciable a la velocidad de reacción.

### 1.3.2. Curvas de calibrado

En las condiciones químicas e instrumentales óptimas indicadas en la Tabla I.21, establecimos en primer lugar la concentración máxima de quinalfos que podía ser determinada sin causar la saturación del detector, antes de que las curvas cinéticas se hubieran desarrollado hasta un tiempo mínimo de 20 segundos, en el caso de realizar las medidas de las pendientes entre  $t_0$ : 10 y  $t_f$ : 20 segundos, o hasta un tiempo mínimo de 11 segundos, realizando las medidas de las pendientes en un incremento de tiempo de 10 segundos.

Tabla I.21. Condiciones experimentales óptimas.

Condiciones óptimas en las jeringas de llenado		Condiciones instrumentales óptimas
Jeringa 1	Jeringa 2	
[quinalfos] = variable % etanol = 5 %	[NaOH] = 3 M	$\lambda_{ex} = 353 \text{ nm}$ $\lambda_{em} = 418 \text{ nm}$ Rendija ex/em = 8/16 nm Voltaje = 900 V Temperatura = 25 °C

La concentración máxima de quinalfos (en cubeta) que podía ser determinada bajo las condiciones establecidas, resultó ser  $1.75 \mu\text{g mL}^{-1}$ , determinando la velocidad entre 10 y 20 segundos y  $3.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ , determinando la velocidad máxima en un intervalo de 10 segundos.

Comprobamos que la relación entre la concentración de quinalfos y la velocidad era lineal en todo el intervalo, por lo que construimos las rectas de calibrado hasta los límites previamente establecidos. Para ello, preparamos cada patrón por triplicado, de cada réplica se registran dos curvas cinéticas y se calcula la curva media (Figura I.33) que suavizamos utilizando el algoritmo de Savitsky-Golay.

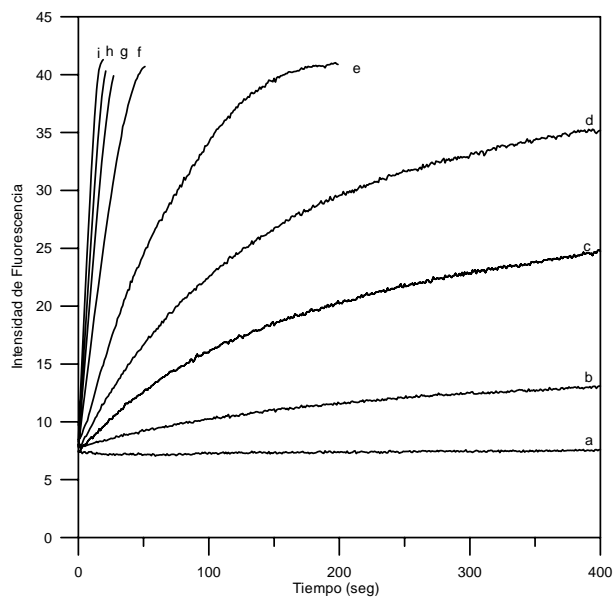


Figura I.33. Curvas cinéticas de la reacción de hidrólisis de quinalfos para patrones de distinta concentración. a:  $0 \mu\text{g mL}^{-1}$ , b:  $0.058 \mu\text{g mL}^{-1}$ , c:  $0.174 \mu\text{g mL}^{-1}$ , d:  $0.29 \mu\text{g mL}^{-1}$ , e:  $0.58 \mu\text{g mL}^{-1}$ , f:  $1.16 \mu\text{g mL}^{-1}$ , g:  $1.74 \mu\text{g mL}^{-1}$ , h:  $2.32 \mu\text{g mL}^{-1}$ , i:  $2.9 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

En la Tabla I.22 se muestran los resultados de velocidad obtenidos para cada patrón de quinalfos.

Tabla I.22. Velocidades de reacción en función de la concentración de quinalfos.

$[\text{quin}]_{\text{cubeta}}$ $\mu\text{g mL}^{-1}$	Velocidad ( $t_0: 10, t_f: 20$ ), ( $\text{s}^{-1}$ )	Velocidad máxima ( $\Delta t: 10$ ) ( $\text{s}^{-1}$ )
0	-0.0211	0.0093
	-0.0237	0.0141
	-0.0238	0.0105
0.058	0.0299	0.0355
	0.0251	0.0385
	0.0343	0.0484
0.174	0.0729	0.0948
	0.0979	0.1129
	0.1121	0.1129
0.29	0.1610	0.1808
	0.2057	0.2091
	0.2132	0.2171
0.58	0.3777	0.4089
	0.3593	0.3656
	0.4070	0.4184
1.16	0.8087	0.8251
	0.8723	0.9105
	0.8139	0.8504
1.74	1.0830*	1.1895*
	1.2267	1.3304
	1.3039	1.4089
2.32	-	1.7448
	-	1.7765
	-	1.8609
2.90	-	2.2727
	-	2.3223
	-	2.3175

\*Valor rechazado

La curva de calibrado obtenida determinando la velocidad de reacción entre los 10 y 20 segundos se muestra en la Figura I.34 y, en la Figura I.35, se representa la curva de calibrado obtenida al determinar la velocidad máxima de reacción. En ambas curvas se ha realizado un ajuste lineal mediante mínimos cuadrados.

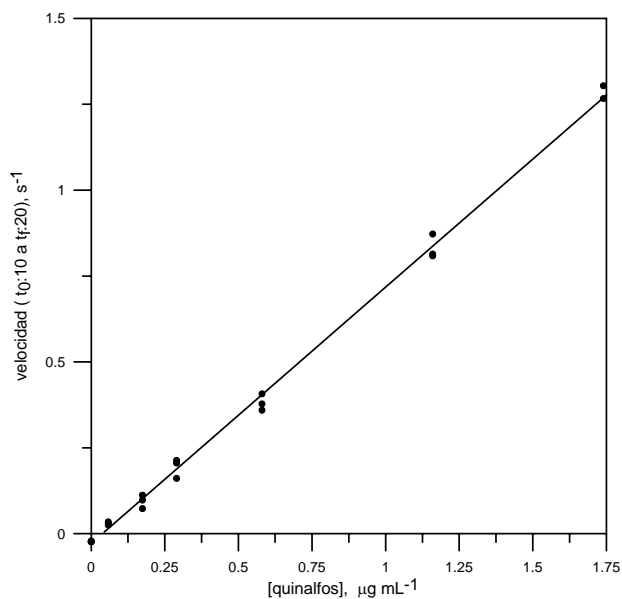


Figura I.34. Curva de calibración para el quinalfos determinando la velocidad de reacción entre los 10 y 20 segundos. Recta de calibrado 1.

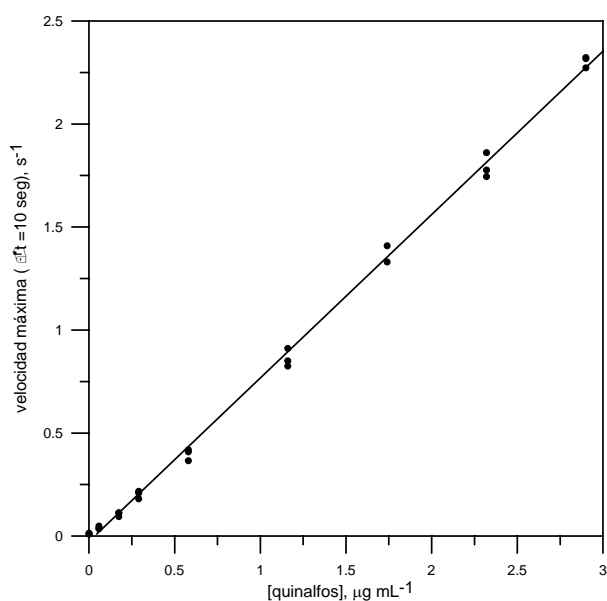


Figura I.35. Curva de calibración para el quinalfos determinando la máxima velocidad de reacción. Recta de calibrado 2.

En la Tabla I.23, se recogen los parámetros estadísticos correspondientes a las dos curvas de calibración anteriores.

Tabla I.23. *Parámetros estadísticos de las rectas de calibrado y parámetros analíticos de calidad.*

	<b>Recta de calibrado 1 (0.058 - 1.74 <math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>)</b>	<b>Recta de calibrado 2 (0.058 - 2.9 <math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>)</b>
Ordenada Origen	-0.013 $\pm$ 0.009	-0.0210 $\pm$ 0.0103
Pendiente ( $\text{mL } \mu\text{g}^{-1}$ )	0.717 $\pm$ 0.012	0.788 $\pm$ 0.007
Coef. Regresión	0.999	0.999
$S_{y/x}$	0.029	0.038
Linealidad	99 %	99 %
LOD Clayton <sup>[36]</sup> ( $\alpha = \beta = 0.05$ ) ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	0.07	0.10
LOD Long y Winefordner <sup>[37]</sup> ( $k = 3$ ) ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	0.030	0.040
Sensibilidad analítica <sup>[38]</sup> , $\gamma^{-1}$ ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	0.031	0.047

Salvo la extensión del rango obtenido en la recta de calibrado 2, el resto de parámetros no difieren significativamente, como posteriormente comprobaremos en el apartado I.4.1 del presente capítulo.

### ***1.3.3. Estudio de la precisión***

La precisión de los dos métodos propuestos se estudió preparando una serie de 10 réplicas de dos disoluciones patrón de quinalfos, cuyas concentraciones finales eran 0.75 y 1.3  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente, en la cubeta de medida. Las variables químicas e instrumentales son las indicadas anteriormente en la Tabla I.21.

En la Tabla I.24 y la Tabla I.25 se muestran las velocidades determinadas, así como las concentraciones estimadas a partir de las rectas de calibrado 1 y 2, para cada una de las concentraciones de quinalfos ensayadas.



Tabla I.24. Concentraciones predichas con la recta de calibrado 1.

<b>[quinalfos]<sub>teórica</sub> = 0.75 µg mL<sup>-1</sup></b>			<b>[quinalfos]<sub>teórica</sub> = 1.30 µg mL<sup>-1</sup></b>		
Muestra	Velocidad (t <sub>0</sub> :10 a t <sub>f</sub> :20) (s <sup>-1</sup> )	[quinalfos] <sub>calculada</sub> (µg mL <sup>-1</sup> )	Muestra	Velocidad (t <sub>0</sub> :10 a t <sub>f</sub> :20) (s <sup>-1</sup> )	[quinalfos] <sub>calculada</sub> (µg mL <sup>-1</sup> )
1	0.5022	0.7291	1	0.8826	1.2595
2	0.4772	0.6942	2	0.9006	1.2846
3	0.4982	0.7235	3	0.8991	1.2826
4	0.5113	0.7418	4	0.8908	1.2710
5	0.4985	0.7239	5	0.9023	1.2870
6	0.5030	0.7302	6	0.8976	1.2805
7	0.5086	0.7380	7	0.9044	1.2899
8	0.5273	0.7641	8	0.8935	1.2747
9	0.5122	0.7430	9	0.9023	1.2870
10	0.5165	0.7490	10	0.8864	1.2648
Valor medio ± SD		<b>0.73 ± 0.02</b>	Valor medio ± SD		<b>1.28 ± 0.01</b>
RSD (%)		2.5	RSD (%)		0.8
Varianza, s <sup>2</sup>		0.00036	Varianza, s <sup>2</sup>		0.00010

Tabla I.25. Concentraciones predichas con la recta de calibrado 2.

<b>[quinalfos]<sub>teórica</sub> = 0.75 µg mL<sup>-1</sup></b>			<b>[quinalfos]<sub>teórica</sub> = 1.30 µg mL<sup>-1</sup></b>		
Muestra	Velocidad máxima (Δt: 10) (s <sup>-1</sup> )	[quinalfos] <sub>calculada</sub> (µg mL <sup>-1</sup> )	Muestra	Velocidad máxima (Δt: 10) (s <sup>-1</sup> )	[quinalfos] <sub>calculada</sub> (µg mL <sup>-1</sup> )
1	0.5613	0.7461	1	1.0208	1.3288
2	0.5582	0.7421	2	1.0214	1.3296
3	0.5520	0.7343	3	0.9884	1.2877
4	0.5474	0.7285	4	1.0046	1.3083
5	0.5608	0.7454	5	0.9959	1.2972
6	0.5554	0.7386	6	1.0085	1.3132
7	0.5553	0.7385	7	1.0123	1.3180
8	0.5672	0.7536	8	1.0008	1.3034
9	0.5629	0.7481	9	1.0151	1.3216
10	0.5562	0.7396	10	1.0058	1.3098
Valor medio ± SD		<b>0.74 ± 0.01</b>	Valor medio ± SD		<b>1.31 ± 0.01</b>
RSD (%)		1.0	RSD (%)		1.0
Varianza, s <sup>2</sup>		0.000049	Varianza, s <sup>2</sup>		0.000169

Como observamos en las tablas anteriores, las predicciones realizadas con la recta de calibrado 2 son ligeramente más precisas para el menor valor de concentración ensayado. No obstante, la precisión de las estimaciones es bastante aceptable con ambas rectas.

También se estudió la precisión de las medidas en días diferentes, utilizando las dos curvas de calibración realizadas. Para ello, se preparó diariamente ( $n = 6$ ) una disolución patrón de  $2 \mu\text{g mL}^{-1}$  de quinalfos al 5 % de etanol, que llenó la jeringa de carga 1. La jeringa de carga 2 contenía una disolución de hidróxido sódico 3 M. Así, la cubeta de medida contenía  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  de quinalfos al 2.5% de etanol y NaOH 1.5 M.

En la Tabla I.26 se detallan los resultados obtenidos.

Tabla I.26. Estudio de la precisión realizado en 6 jornadas diferentes.

<b>[quinalfos]<sub>teórica</sub> = 1.0 <math>\mu\text{g mL}^{-1}</math></b>					
Recta de calibrado 1			Recta de calibrado 2		
Muestra	Velocidad ( $t_0:10$ a $t_f:20$ ) ( $\text{s}^{-1}$ )	[quinalfos] <sub>calculada</sub> ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Muestra	Velocidad máxima ( $\Delta t: 10$ ) ( $\text{s}^{-1}$ )	[quinalfos] <sub>calculada</sub> ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
Día 1	0.6707	0.9641	Día 1	0.7201	0.9475
Día 2	0.6342	0.9132	Día 2	0.7085	0.9328
Día 3	0.7464	1.0696	Día 3	0.7936	1.0407
Día 4	0.6182	0.8909	Día 4	0.6922	0.9121
Día 5	0.6949	0.9978	Día 5	0.7096	0.9342
Día 6	0.7188	1.0311	Día 6	0.8050	1.0551
Valor medio $\pm$ SD		<b>0.98 <math>\pm</math> 0.07</b>	Valor medio $\pm$ SD		<b>0.97 <math>\pm</math> 0.06</b>
RSD (%)		7.0	RSD (%)		6.3
Varianza, $s^2$		0.0048	Varianza, $s^2$		0.0037

Se realizó un estudio estadístico para determinar si una población era más variable que otra (medidas realizadas el mismo día y distintos días). Para ello, se realizó una comparación de las varianzas mediante el test F de Fisher.

En la Tabla I.27 se indican los valores de varianza obtenidos en los distintos ensayos con las dos rectas de calibrado.

Tabla I.27. Varianza.

	[quinalfos] $\mu\text{g mL}^{-1}$	$s_i^2$	
		Calibración 1	Calibración 2
Ensayos realizados mismo día	C <sub>1</sub> : 0.75	0.00036	0.000049
	C <sub>2</sub> : 1.3	0.00010	0.000169
Ensayos realizados distintos días	C <sub>3</sub> : 1.0	0.0048	0.0037

En la Tabla I.28 se muestran los valores de  $F_{\text{cal}}$  y  $F_{\text{tab}}$  obtenidos para ambas rectas de calibrado y valores de concentración ensayados.

Tabla I.28. Resultados del test de Fisher.

	$F_{\text{cal}}$	$F_{\text{tab}}(0.05, 5, 9): 3.48$
C <sub>1</sub> , C <sub>3</sub> , recta 1	<b>13.3</b>	Difieren significativamente
C <sub>1</sub> , C <sub>3</sub> , recta 2	<b>75.5</b>	Difieren significativamente
C <sub>2</sub> , C <sub>3</sub> , recta 1	<b>48</b>	Difieren significativamente
C <sub>2</sub> , C <sub>3</sub> , recta 2	<b>21.9</b>	Difieren significativamente

De acuerdo con el test de Fisher, existen diferencias estadísticamente significativas en los resultados de la repetitividad utilizando el reactor de flujo detenido. Este hecho, probablemente sea debido a que la dispersión de los resultados el mismo día es menor que para distintos días.

### ***1.3.4. Estudio de la selectividad del método propuesto***

La selectividad del método se estudió por adición de otros pesticidas, al igual que se operó en el apartado I.2.5.

A una disolución de quinalfos se le adicionan volúmenes variables de los pesticidas en estudio, obteniendo distintas relaciones quinalfos:interferente. La jeringa de carga 1 contenía las disoluciones de quinalfos:interferente, siendo la concentración de quinalfos en la cubeta de medida de  $0.432 \mu\text{g mL}^{-1}$ , mientras que la jeringa de carga 2 contenía la disolución de hidróxido sódico cuya concentración en la cubeta de medida era de 1.5 M. Se registraron las curvas cinéticas correspondientes y se midieron las pendientes.

En la Tabla I.29 se muestran las recuperaciones obtenidas para las distintas sustancias ensayadas, a las mayores proporciones a las que no se observaron interferencias en la determinación de quinalfos.

*Tabla I.29. Estudio de interferencias.*

<b>Interferente</b>	<b>Interferente : Quinalfos (masa : masa)</b>	<b>Recuperación (%)</b>	
		Recta de calibrado 1	Recta de calibrado 2
METIL-PARATION	5 : 1	90	91
ETIL-PARATION	5 : 1	100	96
FENITROTION	5 : 1	90	90
CLORPIRIFOS	5 : 1	100	93
METIDATION	100 : 1	93	101
SIMAZINA	100 : 1	94	102

Se comprobó que metil-paratión, etil-paratión, fenitrotión y clorpirifos no interferían en la determinación cinética de quinalfos en, al menos, una relación 5:1, mientras que el metidatión y la simazina no interferían en todo el rango estudiado (de interferente:quinalfos 1:1 a 100:1), obteniéndose porcentajes de recuperación en todos los casos entre el 90 y 110 %.

#### I.4. COMPARACIÓN DE MÉTODOS

Comparamos los dos métodos desarrollados para la determinación cinética de quinalfos, con objeto de comprobar si existen diferencias estadísticamente significativas en las predicciones realizadas con cada uno de ellos.

En primer lugar, compararemos las predicciones obtenidas al calcular la velocidad en un intervalo de tiempo fijo y al calcular la velocidad máxima (intervalo de tiempo variable), tanto al operar con el reactor de flujo detenido como sin él y, posteriormente, compararemos las predicciones realizadas en modo clásico y en modo flujo detenido (midiendo la velocidad en un intervalo fijo de tiempo y la velocidad máxima de hidrólisis). Para ello, se preparan un conjunto de muestras donde varía la concentración de nuestro analito y se analizan mediante los distintos métodos.

Los errores más comunes que pueden obtenerse, cuando el conjunto de muestras se analiza por dos métodos, pueden ponerse de manifiesto mediante técnicas de regresión [40]. La ausencia de todo error en los datos se manifestaría mediante la obtención de una línea recta de pendiente unidad y ordenada en el origen cero, tal como muestra la línea discontinua de la Figura I.36. La presencia de un error sistemático proporcional llevaría a la obtención de una recta (**a**), con pendiente distinta a la unidad, mientras que la presencia de errores sistemáticos constantes conduciría a la obtención de una recta con una ordenada en el origen distinta de cero, línea (**b**). Los errores aleatorios que acompañan siempre a todo tipo de resultados, darían lugar a una dispersión de los puntos experimentales alrededor de la línea de regresión. De este modo, la presencia de los tres tipos de errores mencionados, aleatorios, sistemáticos constantes y sistemáticos proporcionales, daría lugar a la línea (**c**).

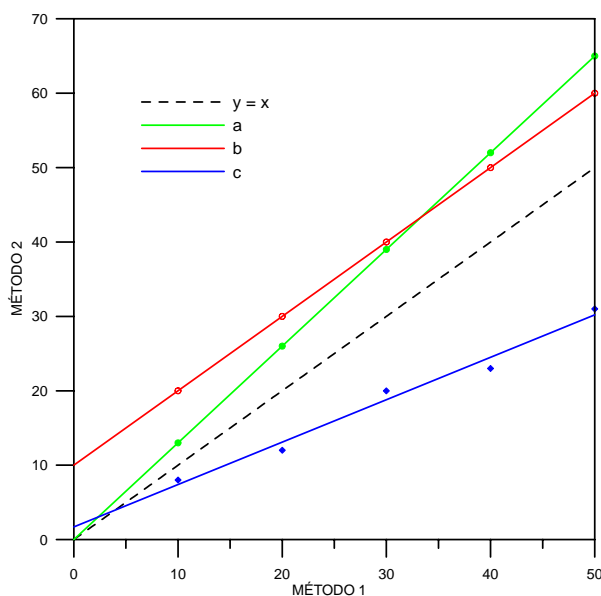


Figura 1.36. Presencia de errores sistemáticos proporcionales (a), errores sistemáticos constantes (b) y errores sistemáticos constantes, sistemáticos proporcionales y aleatorios (c).

El análisis de regresión parece el más indicado para detectar y cuantificar este tipo de errores. La técnica de regresión lineal por mínimos cuadrados es la que normalmente se utiliza, pero hay que señalar que, desde el punto de vista estadístico, existe una diferencia notable cuando dicha técnica se aplica a la calibración o cuando se utiliza, como en esta ocasión, para comparar dos conjuntos de resultados obtenidos experimentalmente. Este hecho es debido a que, en este último caso, ninguno de los dos conjuntos de datos está libre de error, por lo que se tendrían que aplicar técnicas de regresión que contemplen la presencia de errores en ambos ejes de coordenadas  $x$  e  $y$ , a diferencia de la calibración, en donde se considera que el eje  $x$  está libre de error o, al menos, es despreciable frente al de la variable del eje  $y$ .

En nuestro estudio, utilizaremos un criterio gráfico basado en un método de regresión lineal de mínimos cuadrados bivariados (BLS) que considera los errores en ambos ejes [42, 43]. Como, lógicamente, nunca estaremos en el caso ideal de que la pendiente,  $b$ , sea exactamente igual a uno y la ordenada en el origen,  $a$ , sea cero, al estar siempre presentes los errores aleatorios, será preciso dilucidar si los valores obtenidos no son significativamente distintos de uno y de cero, respectivamente. Esto

se hace mediante la construcción de la región conjunta de confianza para la pendiente y la ordenada en el origen, que da como resultado una elipse, EJCR (elliptical joint confidence region). Si el punto teórico (1,0) está contenido dentro de la región delimitada por la elipse, significa que no existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos métodos para un nivel de confianza elegido, es decir, pueden considerarse iguales las concentraciones obtenidas por ambos métodos, ya que  $b'$  no será estadísticamente diferente de 1 y  $a'$  no será estadísticamente diferente de 0. Si, por el contrario, el punto (1,0) está situado fuera de la elipse, se concluye que, para ese nivel de confianza, existen diferencias significativas entre las concentraciones obtenidas por cada uno de los métodos.

Así, aplicaremos el test de confianza para la pendiente y la ordenada en el origen basado en una regresión lineal de mínimos cuadrados bivariados con ayuda del programa informático ACOC, para un nivel de confianza del 95 %.

#### ***1.4.1. Velocidad máxima vs velocidad calculada en un intervalo de tiempo fijo***

Comparamos las predicciones obtenidas con las rectas de calibrado al determinar la velocidad en un intervalo de tiempo fijo o la velocidad máxima, tanto al operar con el módulo de flujo detenido como sin él. En la Figura I.37 observamos las correspondientes regiones conjuntas, o elipses, de las verdaderas pendiente y ordenada en el origen al comparar ambos modos.

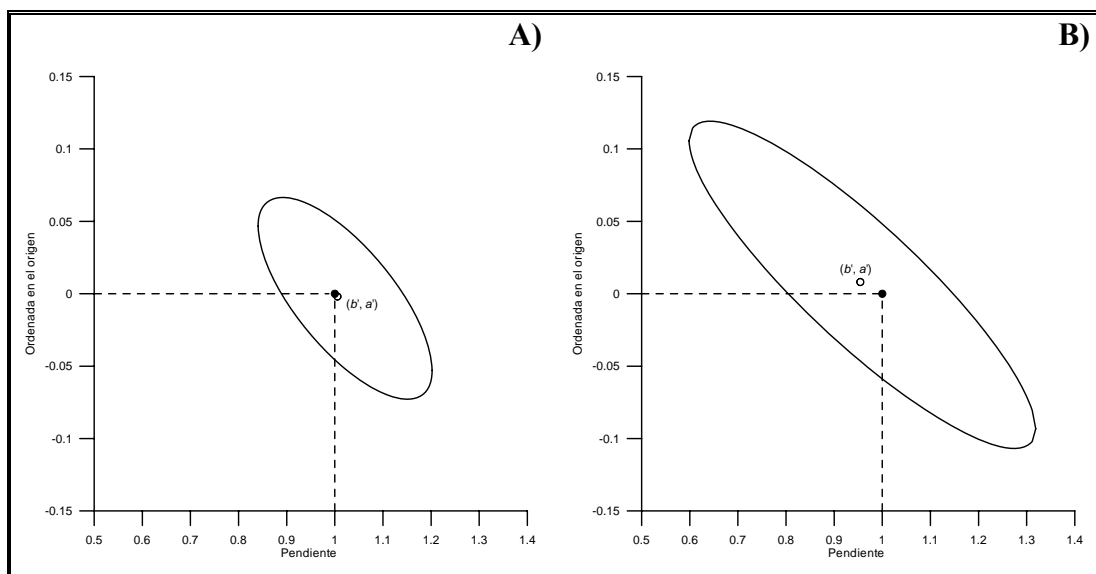


Figura 1.37. Región de confianza para la verdadera pendiente y ordenada en el origen al comparar las predicciones calculando la velocidad en un intervalo de tiempo fijo y la velocidad máxima, en modo clásico A) y en modo flujo detenido B).

Puede apreciarse como, en ambos casos, la pendiente y ordenada en el origen teóricas ( $b = 1$  y  $a = 0$ ) están dentro de la elipse, y por tanto, no difieren significativamente del valor calculado,  $b'$  y  $a'$ , por lo que concluimos que, al comparar ambos modos de determinar la velocidad de hidrólisis, no existen diferencias estadísticamente significativas en las predicciones obtenidas para el nivel de confianza elegido.



### 1.4.2. Modo clásico vs modo en flujo detenido

Comparamos las predicciones obtenidas en modo clásico y en modo flujo detenido. En la Figura I.38, observamos las correspondientes regiones conjuntas, o elipses, de las verdaderas pendiente y ordenada en el origen, al comparar ambos métodos.

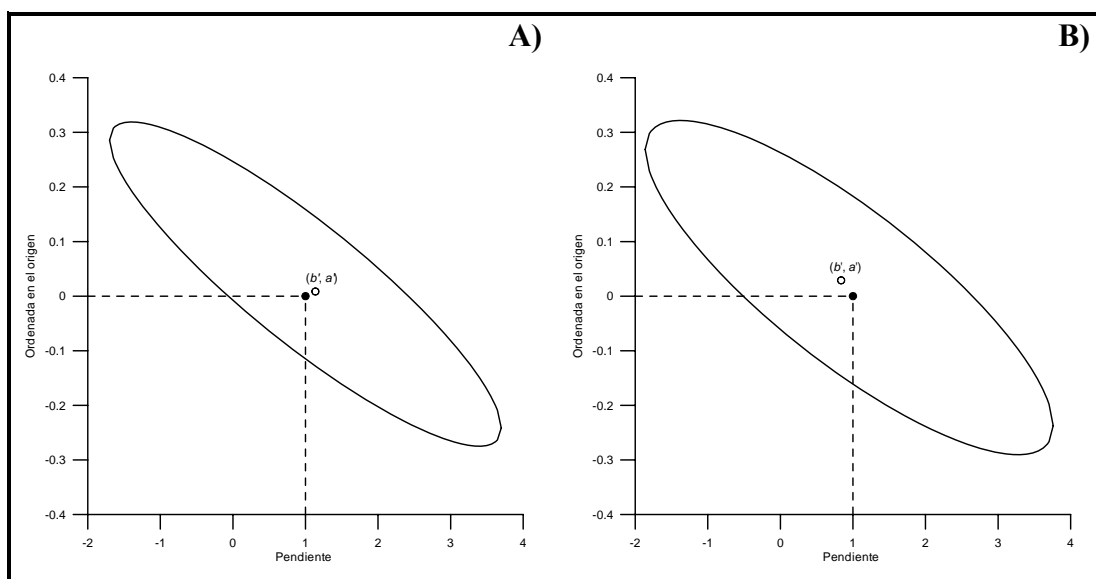


Figura I.38. Región de confianza para la verdadera pendiente y ordenada en el origen al comparar las predicciones en modo clásico y en modo flujo detenido. Velocidad de reacción calculada en un intervalo de tiempo fijo A) y velocidad máxima B).

En ambos casos, la pendiente y ordenada en el origen teóricas ( $b = 1$  y  $a = 0$ ) están dentro de la elipse, o lo que es lo mismo, no difieren significativamente del valor calculado,  $b'$  y  $a'$ , por lo que concluimos que no existen diferencias estadísticamente significativas en las predicciones realizadas con ambos métodos, clásico y en flujo detenido, para un nivel de confianza del 95 %.

## **I.5. APLICACIONES**

### ***I.5.1. Extracción en fase sólida***

Con objeto de determinar quinalfos en diversas aguas, se optimizó un proceso previo de extracción en fase sólida, para eliminar posibles interferencias y preconcentrar las muestras.

La extracción en fase sólida, SPE, es una técnica de preparación y tratamiento de muestras, que está basada en la retención selectiva de los analitos y en su posterior elución. Se realiza previamente a la determinación analítica de los mismos, siendo sus objetivos principales:

- ✓ Enriquecimiento de trazas.
- ✓ Limpieza de muestras.
- ✓ Fraccionamiento de muestras.
- ✓ Almacenamiento de analitos que son inestables en un medio líquido o que tienen volatilidad elevada.
- ✓ Reacciones de derivatización entre grupos reactivos del analito(s) y los grupos de la superficie del adsorbente.

La SPE es un proceso físico en el que están implicadas una fase sólida (normalmente consiste en una fase orgánica enlazada a pequeñas partículas porosas de sílice o en un polímero orgánico) y, una segunda fase, que normalmente es un líquido, aunque también puede ser una emulsión, un gas o un fluido supercrítico. La fase sólida tiene mayor atracción por los analitos que el disolvente en el que se encuentran disueltos. Cuando la disolución de la muestra pasa a través del lecho de adsorbente, los analitos se concentran en su superficie, mientras que los otros componentes de la muestra no retenidos pasan a través de él. Se pueden conseguir

extracciones muy selectivas eligiendo adsorbentes que retengan a los analitos pero no a los otros componentes de la muestra.

Se pueden distinguir cuatro etapas en SPE:

- ✓ *Acondicionamiento de la fase sólida:* Corresponde al acondicionamiento del cartucho para que esté solvatado. Preparación de la fase sólida para que pueda interactuar adecuadamente con la muestra.
- ✓ *Adsorción:* La muestra con los analitos e interferentes pasa a través del adsorbente. El adsorbente retiene selectivamente a los analitos y alguna interferencia, mientras que otras interferencias pasan sin ser retenidas.
- ✓ *Lavado:* El adsorbente se lava con un disolvente selectivo, adecuado para eluir solamente las interferencias retenidas, mientras que los analitos permanecen en el lecho adsorbente.
- ✓ *Elución:* Los analitos concentrados y purificados son eluidos del adsorbente.

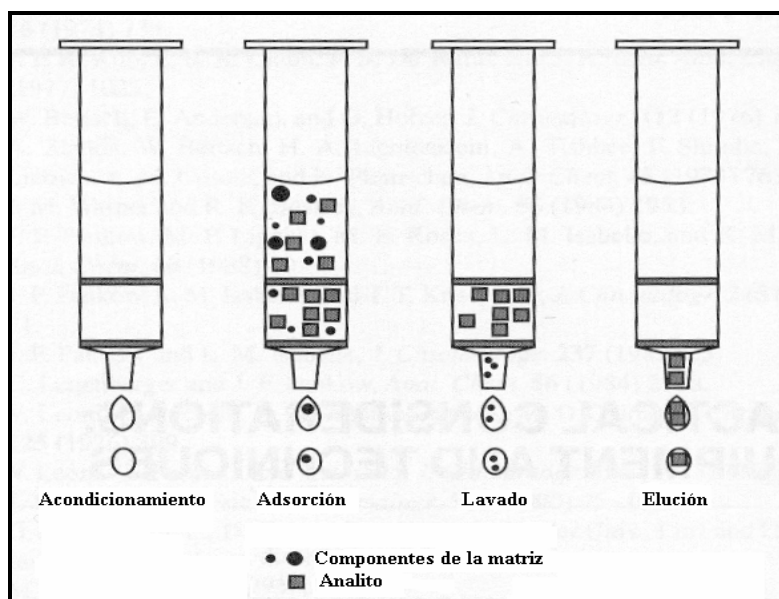


Figura I.39. Etapas en la utilización de un procedimiento de extracción en fase sólida.

En bibliografía hemos encontrado diversas referencias en las que se emplea esta técnica como etapa de concentración previa, normalmente a una cromatográfica, en la determinación de mezclas de pesticidas organofosforados, entre los que se encuentra nuestro analito. Se han empleado diversos cartuchos para retener quinalfos, C<sub>18</sub> [5] y cartuchos con diversos soportes poliméricos [7].

Nuestro objetivo era aislar un compuesto no iónico, como es el quinalfos, de una matriz acuosa. Para esta aplicación requerimos un adsorbente apolar, por lo que seleccionamos cartuchos de C<sub>18</sub>, octadecilsilano, que consisten en sílice enlazada, mediante silanización, a una cadena hidrocarbonada -C<sub>18</sub>H<sub>37</sub>, con lo cual trabajaremos en fase inversa. Así, las interacciones responsables en la retención de nuestro analito se producirán por fuerzas de van der Waals o fuerzas de dispersión.

Las interacciones no-polares entre adsorbentes no-polares y analitos no-polares se ven favorecidas en medios cuyos disolventes son de naturaleza polar, y se rompen con disolventes que tengan algún carácter no-polar.

Inicialmente, se procedió al acondicionamiento del cartucho, etapa requerida para activar la fase sólida y permitir el contacto necesario entre la fase sólida apolar (C<sub>18</sub>) y la solución polar (agua), en la que se encuentra nuestro analito. Para ello, pasamos 10 mL de metanol seguidos de 10 mL de agua milli Q, a una velocidad de 1.5 mL min<sup>-1</sup>, aproximadamente. A continuación, pasamos la muestra acuosa que contenía nuestro analito a la misma velocidad.

Realizamos diversas experiencias para optimizar el proceso de extracción: elección del eluyente y del pH en las muestras.

➤ *Elección del eluyente*

Para llevar a cabo este ensayo, procedemos del modo anteriormente descrito, acondicionamos el cartucho C<sub>18</sub> e introducimos 10 mL de una disolución acuosa de 1 µg mL<sup>-1</sup> de quinalfos, con un 5 % de etanol. Posteriormente, extraemos el quinalfos retenido con distintos eluyentes. En todos los casos se mantuvo un caudal a través del cartucho de 1.5 mL min<sup>-1</sup>, aproximadamente.

Posteriormente, evaporamos el eluido con objeto de tener el quinalfos obtenido en una disolución acuosa al 5 % de etanol, que cargaremos en la jeringa 1 del reactor de flujo parado, mientras que en la 2 tendremos hidróxido sódico 3 M. Así, en la celda de medida del espectrofluorímetro, tendremos una disolución acuosa de quinalfos al 2.5 % de etanol e hidróxido sódico 1.5 M, con lo que registraremos la correspondiente curva cinética y determinaremos el quinalfos presente mediante los dos métodos propuestos en los apartados I.2 y I.3 del presente capítulo.

En todos los ensayos llevados a cabo se concluyó que bastaba con realizar una sola elución con 5 mL de eluyente, ya que en las sucesivas eluciones, el porcentaje de quinalfos obtenido era mínimo. En la Tabla I.30 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla I.30. Elección del eluyente.

Eluyente	Recuperación (%)	
	Velocidad (t <sub>0</sub> :10 a t <sub>f</sub> :20) (s <sup>-1</sup> )	Velocidad máxima (Δt: 10) (s <sup>-1</sup> )
70 % agua : 30 % etanol	7	9
30 % agua : 70 % etanol	36	43
100 % etanol	64	65
70 % etanol : 30 % éter	66	72
30 % etanol : 70 % éter	76	77
20 % etanol : 80 % éter	77	77
<b>100 % éter</b>	<b>85</b>	<b>84</b>
100 % diclorometano	71	72

En la tabla anterior comprobamos como aumenta el porcentaje de recuperación de nuestro analito al disminuir la polaridad del eluyente, obteniéndose los mejores resultados al utilizar éter dietílico como eluyente.

➤ *Influencia del pH*

Las sílices enlazadas son estables en el rango de pH de 2 a 7.5. A  $\text{pH} > 7.5$  el sustrato de la sílice puede disolverse en medio acuoso. A  $\text{pH} < 2$  el enlace sililéter es lábil, originándose la pérdida de los grupos funcionales, modificándose, por tanto, las propiedades de adsorción.

Para estudiar la influencia del pH (dentro del rango aconsejado para nuestro adsorbente) en el proceso de extracción, preparamos una disolución de  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  de quinalfos al 5 % en etanol y añadimos unas gotas de ácido clorhídrico o hidróxido sódico diluidos, según proceda, hasta conseguir el pH deseado.

Una vez preparados las distintas disoluciones de quinalfos y ajustado el pH, se procedió a realizar la extracción en fase sólida de 10 mL de muestra eluyendo con 5 mL de éter dietílico. Evaporamos el eluido y disolvemos el residuo en una disolución acuosa al 5 % de etanol, que cargamos en una de las jeringas del reactor de flujo parado, mientras que la otra contenía hidróxido sódico 3 M. Registramos las curvas cinéticas de la hidrólisis del quinalfos y, a través de la medida de la pendiente de cada curva, determinamos el quinalfos presente.

Se comprobó que en el intervalo de pH estudiado (2.4 – 7.5) la retención de quinalfos en el cartucho era prácticamente del 100 %, en todos los casos, y se obtuvieron porcentajes de recuperación en torno al 85 %.

Concluimos que el pH de la muestra no influye en el proceso de extracción propuesto, ni en la etapa de retención, ni prácticamente en la elución del quinalfos. Además, comprobamos que, en el intervalo estudiado, el pH no influye en la cinética

de hidrólisis del quinalfos, ya que se registraron las curvas cinéticas (Figura I.40) de varios patrones con distintos pH y no se obtuvieron diferencias significativas en la medida de las pendientes entre los 10 y 20 segundos, ni en la medida de las pendientes máximas de cada curva.

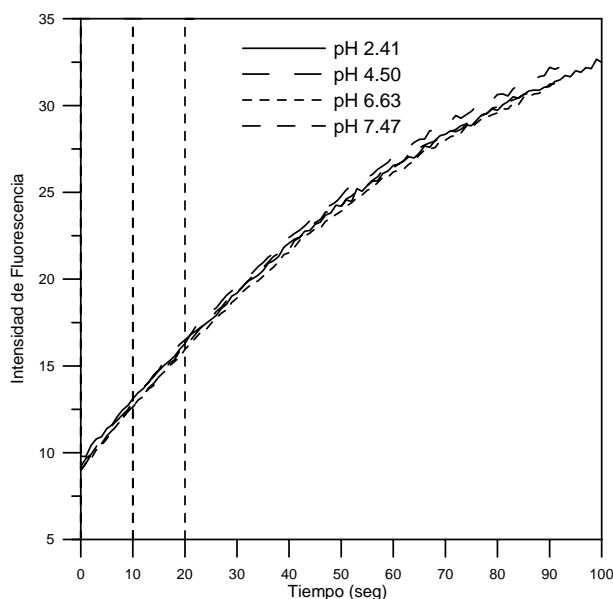


Figura I.40. Curvas cinéticas de la reacción de hidrólisis de  $0.8 \mu\text{g mL}^{-1}$  de quinalfos a distintos pH.

➤ *Montaje empleado*

Para aplicar este proceso de extracción sólido-líquido en muestras acuosas se utilizan volúmenes superiores a los empleados en el proceso de optimización, por lo que el proceso de extracción manual puede ser muy lento y tedioso. Debido a esto, se empleó un montaje desarrollado en el Departamento de Química Analítica de la Universidad de Extremadura, Figura I.41, que permitía acondicionar y pasar la muestra por 10 cartuchos al mismo tiempo.

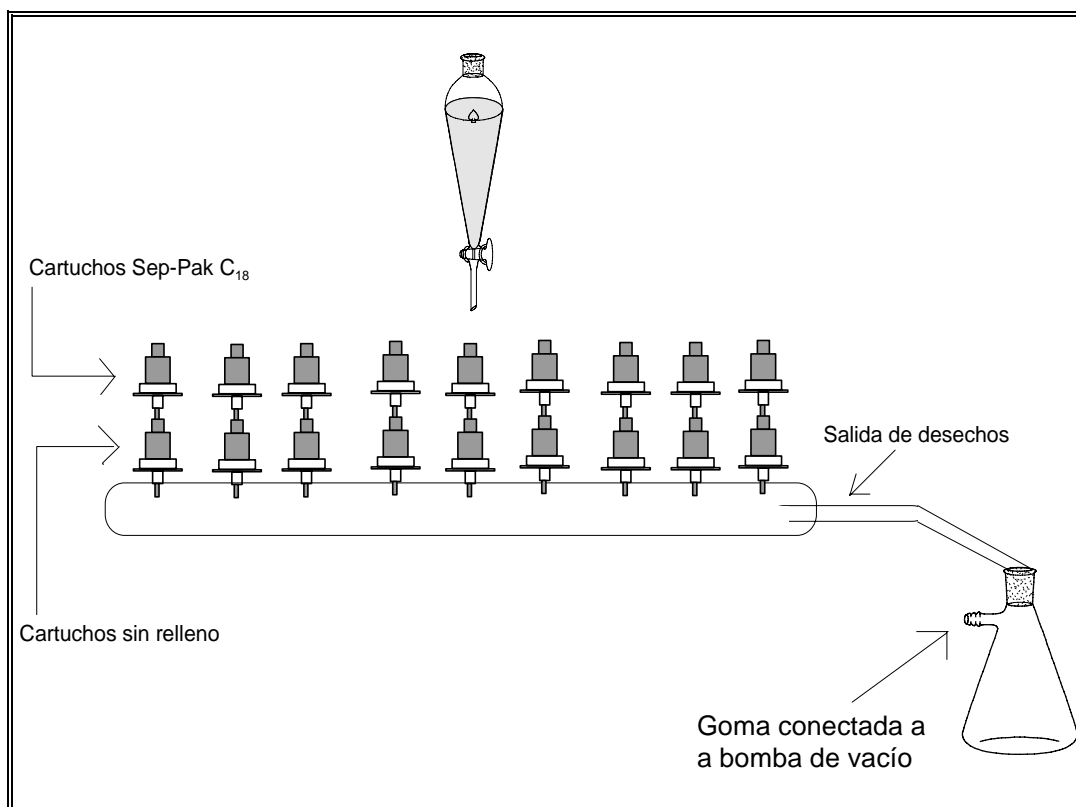


Figura I.41. Montaje empleado para la extracción sólido-líquido de quinalfos en muestras acuosas.

Con ayuda de una bomba de vacío controlábamos el caudal a través de cada cartucho, que fue de  $1.5 \text{ mL min}^{-1}$  aproximadamente. Los disolventes para acondicionar los cartuchos y, posteriormente, la muestra, eran introducidos en unos embudos que estaban conectados mediante gomas a los cartuchos C<sub>18</sub>, unidos a su vez a otros cartuchos sin relleno fijados al tubo de vidrio. Todo el sistema estaba trabajando a vacío y los desechos pasaban a un kitasato conectado a la bomba de vacío.

Una vez acondicionado el cartucho Sep-Pak Plus C<sub>18</sub>, pasábamos 50 mL de agua contaminada y, después, secábamos el cartucho pasando aire durante unos minutos. Comprobamos que con el volumen de muestra seleccionado no se alcanzaba el volumen de rotura del cartucho. Posteriormente, retirábamos el cartucho y, con ayuda de una jeringa, pasábamos manualmente 5 mL de éter dietílico, con objeto de



eluir el quinalfos previamente retenido. El eluido se evaporaba hasta sequedad y el residuo se disolvía en un matraz de 10 mL con agua:etanol (95:5, v:v).

Cuando aplicamos el procedimiento clásico, se transferían 2 mL a la cubeta de medida y se añadía 1 mL de NaOH 4.5 M. Con el módulo de flujo detenido, una de las jeringas se llenaba con la disolución que contenía el quinalfos extraído y se aplicaba el método propuesto.

### ***I.5.2. Determinación de quinalfos en aguas***

La directiva de la Unión Europea (98/83 CE) sobre la calidad de aguas de bebida establece una concentración máxima permitida de 0.1  $\mu\text{g L}^{-1}$  para cada pesticida y de 0.5  $\mu\text{g L}^{-1}$  en total.

Los dos métodos cinéticos, clásico y en flujo detenido, desarrollados en los apartados I.2 y I.3 del presente capítulo, así como el proceso de extracción ya optimizado, se aplicaron para determinar quinalfos en diversas muestras de aguas: agua de red, agua de pozo y agua del Río Guadiana a su paso por Badajoz. Se contaminaron 50 mL de cada agua con quinalfos y se realizó cada ensayo por triplicado. En las tablas Tabla I.31 y Tabla I.32. se muestran las recuperaciones obtenidas.

*Tabla I.31. Recuperaciones de quinalfos operando en modo clásico.*

Muestra	Quinalfos añadido $\mu\text{g mL}^{-1}$	<sup>a</sup> Recuperación (%) $\pm$ SD	
		Velocidad ( $t_0$ : 10, $t_f$ : 60) ( $\text{s}^{-1}$ )	Velocidad máxima ( $\Delta t$ : 50) ( $\text{s}^{-1}$ )
<b>Agua de red</b>	0.10	93 $\pm$ 5	96 $\pm$ 2
	0.22	87 $\pm$ 2	87 $\pm$ 1
<b>Agua de pozo</b>	0.10	82 $\pm$ 5	87 $\pm$ 4
	0.22	80 $\pm$ 5	83 $\pm$ 1
<b>Agua de río</b>	0.10	77 $\pm$ 6	83 $\pm$ 4
	0.22	90 $\pm$ 6	88 $\pm$ 6

<sup>a</sup>Media de tres determinaciones.

Tabla I.32. Recuperaciones de quinalfos operando en flujo detenido.

Muestra	Quinalfos añadido $\mu\text{g mL}^{-1}$	<sup>a</sup> Recuperación (%) $\pm$ SD	
		Velocidad ( $t_0$ : 10, $t_f$ : 20) ( $\text{s}^{-1}$ )	Velocidad máxima ( $\Delta t$ : 10) ( $\text{s}^{-1}$ )
<b>Agua de red</b>	0.042	$70 \pm 5$	$95 \pm 5$
	0.30	$93 \pm 10$	$91 \pm 5$
	0.66	$82 \pm 1$	$82 \pm 2$
<b>Agua de pozo</b>	0.042	$98 \pm 1$	$110 \pm 10$
	0.30	$79 \pm 3$	$75 \pm 5$
	0.66	$80 \pm 2$	$79 \pm 3$
<b>Agua de río</b>	0.042	$94 \pm 6$	$102 \pm 7$
	0.30	$86 \pm 4$	$82 \pm 3$
	0.66	$81 \pm 1$	$81 \pm 1$

<sup>a</sup>Media de tres determinaciones.

En general, las estimaciones realizadas, al determinar la velocidad máxima de reacción, son ligeramente más exactas y precisas que las realizadas al determinar la velocidad en un intervalo fijo de tiempo. Aún así, los valores de recuperación obtenidos son bastantes aceptables en ambos modos, para los tres tipos de agua analizados.

## **I.6. CONCLUSIONES**

Del conjunto de datos recogidos en este capítulo, así como de su discusión y, a la vista de los datos bibliográficos relacionados con ellos, se pueden establecer las siguientes conclusiones:

Mediante la reacción de hidrólisis de Quinalfos en medio básico, se obtiene el quinoxalin-2-ol, compuesto que presenta una elevada fluorescencia, permitiendo así la determinación indirecta del pesticida mediante un método cinético-fluorimétrico.

El medio agua/etanol es el más favorable para llevar a cabo la reacción de hidrólisis de Quinalfos, siendo necesario mantener un porcentaje de etanol mínimo para favorecer la cinética de la reacción, así como la intensidad de fluorescencia del producto de hidrólisis.

El aumento de la concentración de hidróxido sódico favorece la cinética de reacción, hasta un determinado valor, dependiente de la temperatura, en que se hacen independientes para, posteriormente, desfavorecer la hidrólisis debido a la descomposición de nuestro producto.

La velocidad de reacción aumenta exponencialmente con la temperatura, no pudiendo trabajar a valores muy elevados debido al aumento del ruido en la señal analítica y a las limitaciones instrumentales del reactor de flujo detenido.

La velocidad de reacción se ha medido en un intervalo de tiempos fijo y en uno variable, con objeto de determinar la máxima. En ambos casos hemos llegado a las mismas conclusiones, no encontrando diferencias significativas en las predicciones realizadas con sendos modos de operar, para un nivel de confianza del 95 %.

Se han desarrollado dos métodos para la determinación cinética de quinalfos, mezclando los reactivos manualmente en la cubeta de medida (modo clásico) y utilizando el reactor de flujo detenido. Con este segundo método se salvan los inconvenientes derivados de la manipulación de la muestra, siendo la mezcla de los reactivos totalmente reproducible.

Tras comparar las predicciones obtenidas en modo clásico y en modo flujo detenido, concluimos que no existen diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95 %.

Se ha optimizado un tratamiento previo de extracción en fase sólida, con objeto de eliminar posibles interferencias y preconcentrar las muestras. Para ello, se ha trabajado con cartuchos Sep-Pak Plus C18, encontrando que el éter dietílico era el eluyente más adecuado para la extracción.

Se han aplicado los dos métodos cinéticos desarrollados, clásico y en flujo detenido, así como el proceso de extracción optimizado, para determinar quinalfos en diversas muestras de aguas: agua de red, agua de pozo y agua del Río Guadiana a su paso por Badajoz, obteniendo recuperaciones entre el 70 y 110 %, en todos los casos.

## I.7. BIBLIOGRAFÍA

---

1. Goded y Mur, A., *Análisis de Pesticidas*, Editorial Dossat, S.A., Madrid (1966).
2. Barberá, C., *Pesticidas Agrícolas*, 4ª Edición, Ediciones Omega, S.A. Barcelona (1989).
3. Das, K. G., *Pesticide Analysis*, Marcel Dekker, Inc: New York (1981).
4. Husain, S.; Alvi, S. N.; y Rao, R. N., *J. Chromatogr.*, 502 (1990) 208.
5. Hernandez, F., Sancho, J. V., Pozo, O., Lara, A., Pitarch, E., *J. Chromatogr. A.*, 939 (2001) 1.
6. Dalluge J., Van Rijn M., Beens J., Vrelus R. J. J., Brinkman U.A.T., *J. Chromatogr. A*, 965 (2002) 207.
7. Lacassie, E.; Marquet, P.; Gaulier, J. M.; Dreufuss, M. F. y Lachatre, G., *Forensic Sci. Int.*, 121 (2001) 116.
8. Lacassie, E.; Dreyfuss, M. F.; Gaulier, J. M.; Marquet, P.; Daguët, J. L., Lachatre, G. J., *Chromatogr. B ; Biomed. Appl.*; 759 (2001) 109.
9. Oliva, J., Barba, A., Vela, N., Melendrelas, F., Navarro, S., *J. Chromatogr. A*, 882 (2000) 213-.
10. Fernandez, M., Padron, C., Marconi, L., Ghini, S., Colombo, R., Sabatini, A. G., Girotti, S., *J. Chromatogr. A*, 922 (2001) 257.
11. Rossi, S., Dalperio, A. P., Ghini, S., Colombo, R., Sabatini, A. G., Girotti, S., *J. Chromatogr. A*, 905 (2001) 223.
12. Simplício, A. L., Vilas Boas, L., *J. Chromatogr. A*, 833 (1999) 35.
13. Marsin Sanagi M., See H.H., Wan Aini Wan Ibrahim, Ahmedy Abu Naim, *J. Chromatogr. A*, En Prensa.
14. Gallardo E., Barroso M., Margalho C., Cruz A., Vieira D.N., López-Rivadulla M., *J. Chromatogr. B*, 832 (2006) 162.
15. Raju, J. y Gupta, V. K., *J. Microchem.* 39 (1989) 166.
16. García Sanchez, F.; Hernandez Lopez, M. y García Pareja, A., *Anal. Chim. Acta*, 255 (1991) 311-.
17. Rastogi, R. C., Dey, N. C., Buruah, P., *Analyst*, 109 (1984) 1361.
18. Galeano Díaz T., López Martínez L. y Salinas F., *J. Microchem.*, 49 (1994) 61.

19. Galeano Díaz T., López Martínez L. y Salinas F., *Microchim Acta*, 112 (1993) 31.
20. Diaz, T. G., Meras, I.D., Franco, M. F. A., *Water Research*, 36 (2002) 783.
21. Espinosa Mansilla, A., Acedo Valenzuela, M. I., Salinas, F., Cañada Cañada, F., *Anal. Chim. Acta*, 376 (1998) 365.
22. Espinosa Mansilla, A., Muñoz de la Peña, A., Salinas, F., *J. AOAC Int.*, 76 (1993) 1255.
23. Espinosa Mansilla, A., Salinas, F., Zamoro, A., *Talanta*, 41 (1994) 651.
24. Espinosa Mansilla, A., Guiberteau Cabanillas, A., Salinas, F., Mora, N., Zamoro, A., *J. AOAC Int.*, 83 (2000) 1.
25. Espinosa Mansilla, A., Madera, A. Z., Salinas, F., *J. Agric. Food Chem.*, 47 (1999) 1976.
26. Espinosa Mansilla, A., Durán Merás, I., Salinas Lopez, F., *Anal. Chim. Acta*, 320 (1996) 125.
27. Espinosa Mansilla, A., Durán Merás, I., Zamora Madera, A.; Pedano, L., Ferreyra, C. F., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 29 (2002) 851.
28. Espinosa Mansilla, A., de la Peña, A. M., Salinas, F., Alanon, A., Murillo, J. A., *J. Agric. Food Chem.*, 45 (1997) 172.
29. Muñoz de la Peña, A., Acedo Valenzuela, M. I., Espinosa Mansilla, A., Sánchez Maqueda, R., *Talanta*, 56 (2002) 635.
30. Muñoz de la Peña, A., Espinosa Mansilla, A., Acedo Valenzuela, M. I., Goicochea, H. C., Olivieri, A. C., *Anal. Chim. Acta*, 463 (2002) 75.
31. Durán Merás, I., Espinosa Mansilla, A., Rodríguez Gómez, M. J., Salinas, F., *Talanta*, 55 (2001) 623.
32. Muñoz de la Peña, A., Espinosa Mansilla, A., Murillo Pulgarín, J. A., Alañón Molina, A., Fernández López, P., *Talanta*, 48 (1999) 1061.
33. Pérez Bedito, M. D, Valcárcel Cases, M., Métodos Cinéticos de Análisis, Publicaciones del Monte Piedad y Caja de Ahorros de Córdoba y Universidad de Córdoba (1984).

34. Espinosa Mansilla A., Muñoz de la Peña A., Cañada Cañada F., Bohoyo Gil D., González Gómez D., *The Chem. Educ.*, (2007) En prensa.
35. Espinosa Mansilla A., Muñoz de la Peña A., González Gómez D., *The Chem. Educ.* 10 (2005) 1.
36. Andrew Clayton C., Hines J. W., Phillis D. Elkins, *Anal. Chem.* 59 (1987) 2506.
37. Long G. L., Wineford J. D., *Anal. Chem.*, 55 (1983) 712.
38. Cuadros Rodríguez L., García Campaña A. M., Jiménez Linares C., Román Ceba M., *Anal. Lett.*, 26 (1993) 1243.
39. García Campaña A. M., Bosque Sendra J.M., Cuadros Rodríguez L., Almansa López E., *Biomed. Chromatogr.*, 14 (2000) 27.
40. Valcárcel, M., Ríos, A., La calidad en los laboratorios analíticos, Editorial Reverté S.A. (1992).
41. <http://www.statsoftinc.com/textbook/sttable.html#f05>
42. Riu, J., Rius, F. X., *Trends in Anal. Chem.*, 16 (1997) 211.
43. del Río, F. J., Riu, J., Rius, F. X., *Anal. Chim. Acta*, 446 (2001) 49.





**Capítulo II**  
**MÉTODOS DE CALIBRACIÓN MULTIVARIANTE.**  
**FUNDAMENTOS TEÓRICOS**



## II.1. INTRODUCCIÓN

En este capítulo, nos proponemos desarrollar los fundamentos teóricos de las distintas metodologías de calibración multivariante que se emplean a lo largo de esta Memoria, con objeto de conocer las ventajas y desventajas de cada una de ellas, así como sus aplicaciones más adecuadas. Todo ello, intentando evitar, en lo posible, un excesivo desarrollo matemático de los algoritmos implicados.

Es importante definir una serie de conceptos que se emplearán durante el desarrollo de este capítulo y que a menudo se confunden [1]:

- Técnica analítica: procedimiento empleado para determinar la concentración de un analito.
- Método analítico: procedimiento empleado para determinar la concentración de un analito, en una determinada muestra, bajo ciertas condiciones definidas.
- Modelo: descripción de una estructura de datos.
- Algoritmo: procedimiento (conjunto de instrucciones) para realizar una tarea computacional en la cual, desde un estado inicial, se llega a un estado final definido. En este sentido, los procedimientos matemáticos para procesar datos de orden cero, de primer, segundo y tercer orden son algoritmos.

## II.2. CALIBRACIÓN MULTIVARIANTE

Se denominan señales univariantes a aquellas señales analíticas que se miden en un determinado método instrumental, en función de una única variable controlada. Se denomina calibración univariante a aquella que se basa en la construcción de una relación entre dos variables,  $x$  e  $y$ , de manera que  $y$  (variable dependiente) se emplea para predecir  $x$  (variable independiente).

Reciben el nombre de señales multivariantes aquellas que se miden en función de dos o más variables controladas. Por ello, la información que puede obtenerse de las señales univariantes resulta bastante limitada, en comparación con las posibilidades más extensas que poseen las señales multivariantes. Así, podemos tener distintos tipos de datos analíticos:

- Cuando una muestra produce un único dato, por ejemplo, la absorbancia a una única longitud de onda, el conjunto de calibración es un vector, que contiene las medidas para  $I$  muestras de calibrado. Esta calibración sólo funciona cuando la selectividad de la técnica es total, o sea, cuando hay un único analito activo. La calibración se conoce como de orden cero, atendiendo a que los datos producidos por cada muestra son escalares o tensores de orden cero.
- Cuando la muestra produce un vector de datos (tensor de orden uno), como un espectro medido a  $J$  longitudes de onda, el conjunto de calibración es una matriz (tensor de orden dos, tamaño  $I \times J$ ). Estos datos se analizan con métodos de calibración multivariante de primer orden.
- Cuando cada muestra produce una matriz (tensor de orden dos, tamaño  $J \times K$ ), como una matriz de excitación-emisión de fluorescencia, una matriz absorbancia-tiempo, etc., el conjunto de calibración es un cubo (tensor de orden tres, tamaño  $I \times J \times K$ ). Los métodos de calibración se conocen como de segundo orden. También se llama calibración de tres modos o de tres vías, atendiendo al orden tres del cubo de calibrado. En este sentido, la calibración de primer orden se llamaría de dos modos o de dos vías.
- Y así sucesivamente, porque no hay límite teórico para el orden. Una muestra puede producir una matriz de excitación-emisión resuelta en el tiempo, lo que sería un dato de orden tres (calibración de cuatro vías).

En la Tabla II.1 se resumen las diferentes posibilidades.

Tabla II.1. Clasificación de los tipos de datos analíticos y de las calibraciones a las que dan lugar.

La muestra produce	El conjunto de calibración es	La calibración es
Un único dato (escalar)	un vector	Univariante o de orden cero
Un vector de datos	una matriz	Multivariante de primer orden
Una matriz de datos	un cubo	Multivariante de segundo orden
Un cubo de datos	un hipercubo	Multivariante de tercer orden
Un hipercubo de orden $n$	un hipercubo de orden $n+1$	Multivariante de orden $n$

De forma gráfica, las calibraciones multivariantes de primer orden y segundo orden se pueden representar como se muestran en las Figuras II.1 y II.2.

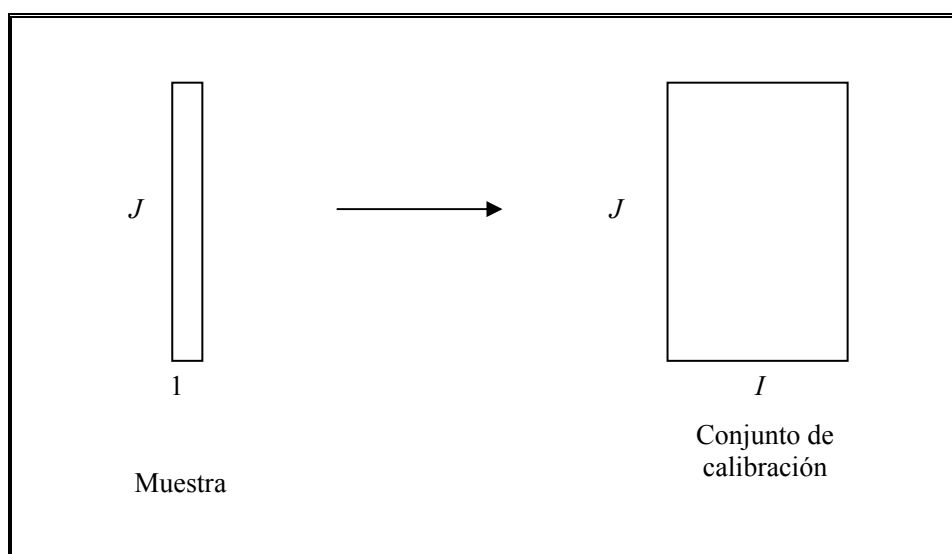


Figura II.1. Esquema de calibración de primer orden.

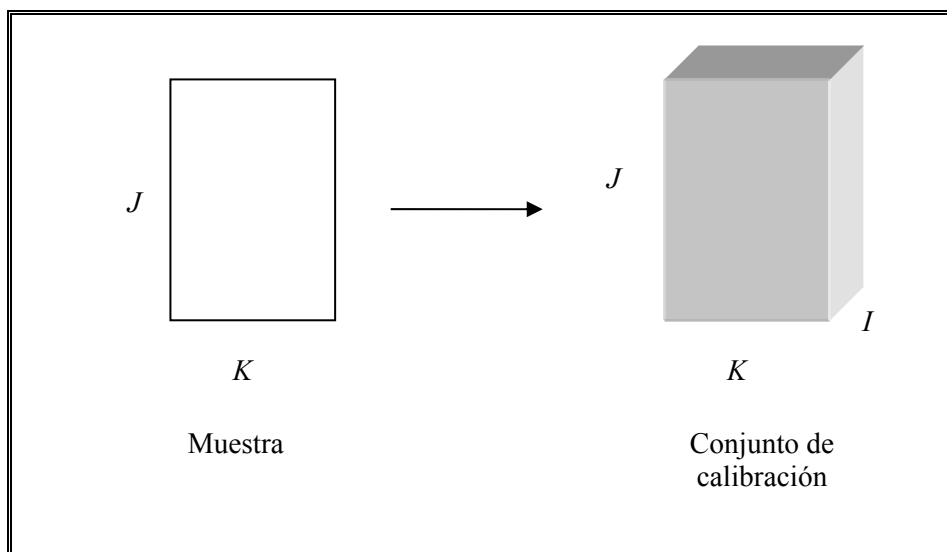


Figura II.2. Esquema de calibración de segundo orden.

En este caso, cada sección del cubo es una matriz de datos para cada una de las  $I$  muestras del conjunto de calibración.

Los datos que se obtienen como tensores de orden superior, son especialmente útiles en el análisis cuantitativo de mezclas complejas de multicomponentes y, específicamente, los tensores de tercer orden, o datos de 3 vías, han alcanzado una gran aceptación analítica [2].

Los procedimientos utilizados en calibración multivariante se basan en la obtención y almacenamiento de las señales correspondientes a un grupo 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 problema de concentración desconocida [3-5].

Mediante los métodos de calibración multivariante [6-8] es posible obtener información cuantitativa selectiva a partir de datos poco selectivos, posibilitándose la determinación simultánea de diversos componentes en muestras complejas, siendo una alternativa a los métodos de separación [9]. 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, ambos aspectos de gran importancia en los análisis de rutina o de control sobre gran cantidad de muestras análogas [10].

El gran número de monografías y trabajos sobre el tema pone de manifiesto el especial interés que los métodos de calibración multivariante 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.

Como ya se ha mencionado, 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.

Cuando se realiza la calibración se debe especificar el número de componentes que se deseen predecir, así como 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 creado 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 quedará implícitamente recogida en el modelo de cálculo, siendo posible por tanto la modulación de las mismas si se encontraran presentes en las muestras reales a analizar.

### **II.2.1. Calibración multivariante de primer orden**

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 ajustar al conjunto de muestras patrón, que recibe el nombre de **conjunto de calibración**. Dicho conjunto de calibración debe generar resultados fiables 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 del conjunto de calibración hace que, determinadas interacciones en disolución, se puedan modular mediante modelos PLS y similares.

Para que un modelo de cálculo cubra las expectativas de predicción esperada sobre muestras reales, debe apoyarse sobre un adecuado conjunto de calibración, es decir, la bondad como herramienta de predicción del modelo va a depender en gran manera del diseño del conjunto de calibración. Dicho conjunto 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 experimental 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, **conjunto de predicción**, tras obtener las correspondientes variables dependientes.



Haremos un tratamiento matemático que nos permita visualizar el método PLS, utilizado en esta memoria, y el método PCA, en el cual se basa. Para ello, consideraremos un método espectroscópico molecular (fluorescencia) y la notación matemática que utilizaremos es la siguiente: las matrices se expresan en mayúsculas y negrita; los vectores en minúsculas y negrita, y los escalares en minúscula; para la traspuesta de una matriz se emplea el exponente T, y para la inversa el -1.

Consideramos los datos formando parte de dos grupos diferentes:

- a) Grupo de las respuestas instrumentales correspondientes a **n** diferentes canales de medida o longitudes de onda sobre las **I** disoluciones patrón, que se reúnen dando lugar a la matriz de datos **X**, de dimensiones **lxn**, en donde cada fila corresponde al espectro de cada una de las disoluciones patrón.
  
- b) Grupo formado por las concentraciones conocidas de los **m** componentes en las **I** disoluciones patrón, agrupadas en una matriz **Y**, de dimensiones **lxm**, en la que las filas son las concentraciones de los diferentes componentes en el conjunto de calibración. En la etapa de calibración se pretende llegar a conocer la relación entre **X** e **Y**, para poder aplicarla al análisis de muestras desconocidas en la etapa de predicción.

#### *1.1.2.1.1. Análisis por componentes principales (PCA)*

De entre los métodos más utilizados quizás sea el más popular, y el algoritmo de descomposición espectral más ampliamente utilizado para llevarlo a cabo, es el algoritmo NIPALS (non linear iterative partial least-squares).

*Descomposición espectral: 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.*

El proceso de descomposición se puede esquematizar indicando los pasos que el algoritmo matemático realiza sobre el conjunto de calibración creado. En primer lugar, calcula el espectro medio, con los espectros de las muestras que componen el conjunto de calibración. A continuación, lo compara con cada uno de los espectros individuales del conjunto de calibración 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 director (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 *escalar (score)*. Calcula la contribución del loading a cada espectro de la calibración y la sustrae de cada espectro individual. Los espectros obtenidos los sustituyen 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*.

El método PCA o Análisis de Componentes Principales (Principal Component Analysis) [11-13] se puede matemáticamente desglosar como una descomposición de la matriz  $\mathbf{X}$  de rango  $\mathbf{l}$ , en una suma de matrices de rango 1 según:

$$\mathbf{X} = \mathbf{M}_1 + \mathbf{M}_2 + \mathbf{M}_3 + \dots + \mathbf{M}_l + \mathbf{E}_x \quad (\text{ec. II.1.})$$

de modo que cada una se pueda escribir como producto de dos vectores: un vector *score*  $\mathbf{t}_1$  y un vector *loading*  $\mathbf{p}_1$ :  $\mathbf{X} = \mathbf{t}_1\mathbf{p}_1^T + \mathbf{t}_2\mathbf{p}_2^T + \mathbf{t}_3\mathbf{p}_3^T + \dots + \mathbf{t}_m\mathbf{p}_m^T + \mathbf{E}_x$  o bien en la forma equivalente:  $\mathbf{X} = \mathbf{TP}^T + \mathbf{E}_x$ , donde  $\mathbf{E}_x$  el residuo de la matriz de datos  $\mathbf{X}$ .

Es decir, la matriz  $\mathbf{X}$  se expresa en un nuevo sistema ortogonal de variables en el que los *scores* ( $\mathbf{T}$ ) representan las coordenadas de cada punto en el nuevo sistema y, los *loadings* ( $\mathbf{P}$ ), los cosenos directores de los nuevos ejes respecto a los anteriores. Así, se pueden relacionar con las concentraciones y con los espectros de los compuestos, respectivamente.

El algoritmo NIPALS no calcula todos los componentes principales al mismo tiempo, calcula  $\mathbf{t}_1$  y  $\mathbf{p}_1^T$  de la matriz  $\mathbf{X}$  y entonces sustrae el producto  $\mathbf{t}_1\mathbf{p}_1^T$  de  $\mathbf{X}$  y calcula el residuo  $\mathbf{E}_1$ , que se emplea para calcular  $\mathbf{t}_2$  y  $\mathbf{p}_2^T$  y así sucesivamente hasta que se llega a la convergencia.

El método PLS, que se tratará seguidamente, utiliza una etapa de PCA en la descomposición factorial.

#### *1.1.2.1.2. Mínimos cuadrados parciales (PLS)*

En el caso más simple de una mezcla de dos componentes, sólo habría, idealmente, dos variables independientes, por lo que el espectro de la mezcla podría ser reconstruido sumando los espectros de los componentes puros.

Realmente, esto no ocurre, ya que generalmente se producen variaciones instrumentales y errores inherentes al muestreo, así como posibles cambios en la línea de base y ruido en el detector. Además, hay que considerar que las posibles interacciones entre los dos componentes puros pueden producir productos intermedios o, simplemente, cambio en el desarrollo del espectro de algún componente respecto a su estado puro. Sin embargo, habrá un número finito de “espectros” matemáticos, que varían de manera independiente, que pueden ser sumados para reconstruir nuestros datos (espectros experimentales). Si estos “espectros” son calculados de algún modo, podrían usarse para reconstruir los espectros “desconocidos”, correspondientes a muestras problemas, multiplicando cada “espectro” por un factor de escala y sumando los resultados, de manera que el nuevo espectro se aproxime notablemente al espectro del problema.

Estas fracciones son conocidas como *scores* o contribución espectral y los “espectros” son conocidos como *loadings*, *vectores loading* o *factores*. Este proceso reduce mucho la complejidad de nuestros datos ya que, a partir de un pequeño número de *vectores loading* y de *scores*, se puede reconstruir un problema dado.

PLS se basa en el análisis mediante PCA y presenta la ventaja de que permite calibrar, predecir y estudiar estadísticamente los residuos en forma separada, para cada componente de una muestra, y es ideal para muestras en las que los componentes tienen intensidades espectrales muy diferentes unos de otros.

Podemos considerar un modelo en el que para cada componente se construye un modelo lineal  $\mathbf{X}$  e  $y$ .

Como se vio en el apartado anterior, la matriz de datos  $\mathbf{X}$  se puede descomponer de la forma:

$$\mathbf{X} = \mathbf{TP}^T + \mathbf{E}_x = \sum \mathbf{t}_m \mathbf{p}_m^T + \mathbf{E}_x \quad (\text{ec. II.2.})$$

Del mismo modo, se puede descomponer la matriz de concentraciones  $\mathbf{Y}$ :

$$\mathbf{Y} = \mathbf{UQ}^T + \mathbf{E}_y = \sum \mathbf{u}_m \mathbf{q}_m^T + \mathbf{E}_y \quad (\text{ec. II.3.})$$

siendo  $\mathbf{U}$  la matriz de scores de  $\mathbf{Y}$ ,  $\mathbf{Q}$  la matriz de loadings de  $\mathbf{Y}$  y  $\mathbf{E}_y$  los residuos del modelo (que son minimizados).

Durante la etapa de calibración, el método de regresión parcial por mínimos cuadrados (PLS), utiliza no sólo la información contenida en la matriz  $\mathbf{X}$ , sino también la contenida en la matriz de concentraciones (matriz  $\mathbf{Y}$ ) de manera que, al mismo tiempo, se utilizan las columnas de  $\mathbf{Y}$  para estimar los *loadings* de  $\mathbf{X}$  y las columnas de  $\mathbf{X}$  para estimar los *loadings* de  $\mathbf{Y}$ .

En un modelo simplificado, los *scores* de cada matriz se calculan por separado y si las fuentes de variación de  $\mathbf{X}$  y de  $\mathbf{Y}$  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 ( $\mathbf{r}$ ):  $t = \mathbf{r}u + e$ . Esto indica que los *scores*  $t$  no son los óptimos para estimar  $\mathbf{X}$  al haber sufrido cierta rotación para describir simultáneamente la matriz  $\mathbf{Y}$ . Por ello, se emplean los *loadings* ponderados (weight loadings)  $\mathbf{w}$ .

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.

La característica más importante de PLS es que la descomposición se realiza de tal forma que los vectores scores presentan máxima covarianza con la variable dependiente  $y$ . Esta es la principal característica que diferencia PLS de PCR.

El algoritmo correspondiente al método PLS [14-23], puede modificarse para conseguir que este método, que asume un modelo lineal, pueda aplicarse, bajo ciertas condiciones, al análisis multivariante no lineal [24].

El método de mínimos cuadrados parciales (PLS) se ha convertido en una herramienta usual de calibración de primer orden, debido a la calidad de los modelos de calibración que se obtienen con él, así como por la disponibilidad de programas informáticos comerciales que permiten utilizarlo de una manera fácil. Una característica importante de PLS es que se puede realizar la calibración, aún cuando no se conozcan explícitamente las concentraciones de los demás componentes de la muestra a analizar.

Sin embargo, todos los métodos de primer orden, incluyendo PLS, son sensibles a la presencia de interferencias no modeladas en la etapa de calibración, lo cual puede conducir a errores en las predicciones. Esta es la situación que se presenta usualmente cuando analizamos muestras naturales de composición compleja, como es el caso de las muestras biológicas.

➤ *Optimización del número de factores*

El número de factores (componentes o loadings) que debemos emplear para optimizar un modelo, debe ser tal que garantice la adecuada resolución del problema con la menor complejidad matemática (menor tiempo de cálculo). Si se emplean 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. La utilización del parámetro **PRESS** (Prediction Residual Error Sum of Squares), suele estar recomendada en la bibliografía especializada.

Podemos considerar que, para cada modelo generado con un determinado número de *loadings*, el PRESS se puede expresar como:

$$\text{PRESS} = \sum_{j=1}^n \sum_{i=1}^m (\hat{C} - C_i)^2 \quad (\text{ec. II.4.})$$

siendo  $n$  = número total de muestras empleadas en la calibración;  $m$  = número total de componentes en la mezcla,  $\hat{C}$  = concentración calculada, y  $C_i$  = concentración de referencia.

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

$$\text{SEP} = [\text{PRESS}/m]^{1/2} \quad (\text{ec. II.5.})$$

Experimentalmente, el PRESS se obtiene mediante el siguiente procedimiento:

- De todos los patrones del conjunto de calibración, se prescinde de un cierto número, generalmente solo uno y, con los restantes, se realiza la descomposición espectral con un solo factor. Se calcula la matriz de calibración mediante regresión.
- Con dicha matriz, se determina la concentración de la muestra (o las muestras) anteriormente desechadas.
- 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).
- A continuación, se deja fuera otra muestra distinta y se repite el proceso. Así, sobre cada una de las muestras que constituyen el conjunto de calibración.
- Como cada muestra es dejada fuera, se añade la raíz cuadrada del error residual calculado a todos los errores previos.
- Se repite el mismo proceso tantas veces como factores se ensayan.

El valor de PRESS nos da una medida de lo bien que una matriz de cálculo (calibración) está determinando la concentración, para cada número de factores tenidos en cuenta. Cuantos más factores se tienen en cuenta, el error de predicción disminuye. En principio, el número de factores óptimo debería ser aquel que proporciona el mínimo valor de PRESS. En algunos casos, se producen mínimos para volver a aumentar ligeramente después. En esta situación, se considera que el modelo comienza a añadir *vectores de ruido*.

Incluir demasiados factores o vectores de ruido se denomina *sobre ajuste*. Incluso se produce sobre ajuste cuando se optimiza el número de factores para el mínimo PRESS, ya que el número de factores óptimos deberá ser realmente aquel que introduce en el sistema un aumento de la capacidad predictiva estadísticamente mejor que cuando se emplea un número inferior. Por lo tanto, se debe recurrir a un tratamiento estadístico de los resultados que ponga este hecho de manifiesto.



Una propuesta de solución a este problema ha sido realizada por Haaland y Thomas [4], de manera que los valores mínimos de PRESS se comparan con aquellos obtenidos con un número de factores menor que el que produce el mínimo PRESS, haciendo uso del parámetro estadístico F. La estadística F realmente se emplea para comparar dos series de concentraciones, las calculadas mediante la aplicación del número de factores que generan el mínimo PRESS, denominado  $h^*$ , y las concentraciones calculadas usando un número inferior de factores, denominado  $h$ . Según disminuyen las diferencias entre el mínimo valor de PRESS y los otros valores, también disminuye la probabilidad de que cada nuevo factor añadido sea significativo.

Todos los modelos con un número de factores  $h < h^*$  se comparan con el de referencia,  $h^*$ . Con ello se pretende encontrar el modelo más simple (de menor número de factores) que genere un valor de PRESS estadísticamente indistinguible del generado por el modelo que emplea  $h^*$ .

Se expresa  $F(h)$  como  $\text{PRESS}(\text{modelo con } h \text{ factores}) / \text{PRESS}(\text{modelo con } h^* \text{ factores})$ , siendo  $h = 1, 2, 3, \dots, h^*$ . Se elige como número óptimo de factores el menor  $h$  que cumple  $F(h) < F_{\alpha, m}$ , siendo  $F_{\alpha, m}$  el  $(1-\alpha)$  por ciento de la probabilidad F de Snedecor con  $m$  grados de libertad, siendo  $m$  el número de muestras del conjunto de calibración.

Haaland y Thomas [25] determinaron empíricamente que un valor de  $(1-\alpha)$  de 0.75 es una buena elección como criterio de significación, de manera que se selecciona como óptimo el número de factores correspondientes al primer valor del PRESS cuya probabilidad para la razón F es menor que 0.75.

La determinación del número de factores óptimos es la etapa más importante del análisis, la que requiere mayor atención. En muchos casos no es posible la asignación de la naturaleza de dichos factores. Sin embargo, sí pueden ser atribuidos aquellos que tienen una relación directa con la concentración de los componentes e, incluso, aquellos debidos a interacciones entre los componentes que afectan a sus concentraciones [25, 26]. También influyen factores de tipo instrumental (como deriva de la línea base, de la

respuesta del detector y de la fuente a lo largo del tiempo), ya que el proceso de ajuste a cero, en muchas ocasiones, sólo se realiza al inicio del análisis. Para asignar la naturaleza de dichos factores se recurre a un profundo examen del perfil de los loadings obtenidos y comparación con los espectros de los componentes puros y sus mezclas, así como, con la evaluación del valor de los scores y su relación con las concentraciones (o relaciones entre las concentraciones), de los componentes del conjunto de calibración (análisis cluster).

El grado de ajuste entre los valores calculados y los teóricos de un modelo se expresa a través de diferentes parámetros estadísticos. Así, si consideramos  $\mathbf{x}_i = \hat{\mathbf{x}}_i + \mathbf{e}_i$ , donde  $\mathbf{x}_i$  es el valor teórico;  $\hat{\mathbf{x}}_i$ , el calculado, y  $\mathbf{e}_i$  el error cometido en el cálculo, podemos calcular la desviación estándar media residual, RMSD (*Residual mean standard deviation*) que es la raíz cuadrada de las desviaciones medias:

$$\text{RMSD} = \sqrt{\frac{\sum_i (\mathbf{x}_i - \hat{\mathbf{x}})^2}{n}} \quad (\text{ec. II.6.})$$

que constituye una medida del error medio cometido en el análisis.

Hay que hacer notar que dicho RMSD es igual al SEP cuando este último se calcula para un componente individual (por ejemplo, mediante PLS1).

Una vez optimizada la matriz de cálculo teniendo en cuenta el número óptimo de factores, se pueden predecir las muestras desconocidas.

#### ➤ *Selección de la región espectral*

Aunque PLS es un método diseñado para usar el espectro completo, nos podemos encontrar con circunstancias o técnicas instrumentales donde elegir la región del espectro está sobradamente justificada. Por ejemplo, en aquellos casos donde se

pueda mejorar la resolución, eliminando zonas de extremadamente alto solapamiento de las señales, zonas de ruido, zonas de no linealidad, o bien con el objeto de disminuir el tiempo de procesamiento de datos. Los métodos matemáticos que posibilitan una elección razonada de la región del espectro adecuado, consisten en calcular la correlación entre la señal analítica, con las concentraciones de cada componente, en los espectros de la matriz de calibración y elegir las regiones que tienen valores de  $R^2$  igual o próximos a 1.

➤ *Detección de muestras discrepantes u outliers*

Además del número de factores, es igualmente importante la detección de muestras que, por algún tipo de errores, deban ser eliminadas en la matriz de calibración.

En un grupo de patrones de calibración pueden existir muestras que se aparten del modelo establecido y que, por consiguiente, puedan ser el origen de errores indeseables. El hecho de que el comportamiento de una muestra, difiera en mayor o menor grado del conjunto, puede deberse a errores en las concentraciones (muestras discrepantes en la concentración), o a errores espectrales debidos a problemas instrumentales o de manipulación (muestras espectralmente discrepantes) o a ambas causas.

Una poderosa herramienta para la detección de muestras erróneas nos la proporciona la misma manera de calcular el PRESS, dejando sucesivamente y cada vez, con todas y cada una de las muestras, una fuera de la calibración. La diferencia entre la concentración puesta y la obtenida puede compararse y servir para detectar las muestras erróneas.

### **II.2.2. Calibración multivariante de segundo orden**

Una buena alternativa para solucionar el problema que genera la presencia de interferencias no modeladas en la etapa de calibración, es la utilización de datos con una estructura dimensional mayor, datos de tres vías [9, 27], que aportarán métodos más robustos frente a la presencia de interferencias y a los efectos de matriz, permitiendo conocer la contribución fundamental de cada analito individual a la señal medida.

Entre los métodos de calibración que emplean datos de segundo orden, la técnica más utilizada es la luminiscencia molecular, mediante registro de las matrices de excitación-emisión (EEMs) o combinación de fluorescencia-tiempo o fluorescencia-pH. Ejemplos de tales métodos para la resolución de mezclas de componentes o para determinar un único componente en muestras complejas se pueden encontrar en una revisión publicada por Bro, con los procedimientos descritos hasta 1995 [28]. Ejemplos más recientes se encuentran reunidos en dos recientes revisiones [29, 1], de los que podemos enumerar la determinación de hidrocarburos aromáticos polinucleares [30], pesticidas de la familia de los carbamatos [31], mezclas ternarias de naftil derivados [32], trifeniltin en agua de mar [33, 34], clorofilas y feopigmentos [35], verapamil en preparados farmacéuticos [36], propanolol, amilorida y dipiridamol [37], mezclas de ácido salicílico y naproxeno en suero y de naproxeno, ácido salicílico y ácido salicílico en orina [38], norfloxacin, enoxacin y ofloxacin en suero [39, 40], doxorubicina en plasma [41], piroxican en suero [42], los pesticidas carbendazina, fuberidazol y tiabendazol [43], carbamacepina en suero y en preparaciones farmacéuticas [44], ciprofloxacino en orina [45], ácido salicílico y sus dos principales metabolitos, salicílico y genticónico [46], interacciones de ácidos fúlvicos y húmicos en suelos [47-49], el antihipertensor nifedipina [50], carbendazina y tiabendazol [51], naproxeno e ibuprofeno en suero y orina [52], ácidos mefenámico, flufenámico y meclofenámico en orina [53, 54], sulfatiazol en mieles [55], enrofloxacin y ciprofloxacino [56, 57] y diclofenac, ciprofloxacino y ofloxacin en orina [58].

La descomposición de los sensores de datos de tres vías (obtenidos cuando se agrupa un conjunto de muestras de datos de segundo orden) es, bajo determinadas condiciones, única, lo cual permite que las concentraciones relativas y los perfiles espectrales de las muestras individuales se puedan extraer directamente. Esto permite la corrección de las contribuciones de los componentes no modelados explícitamente en las muestras. A esta propiedad se la ha llamado “ventaja de segundo orden” [59].

Esta *ventaja de segundo orden* es aprovechada por los distintos métodos de calibración de dos maneras distintas, representadas esquemáticamente en la Figura II.3. La primera opción es que los datos de una muestra desconocida determinan (conjuntamente con los datos de calibración) los coeficientes de regresión que llevan a cabo la predicción (Figura II.3.A), mientras que, en la segunda opción, se obtienen en primer lugar los vectores directores o *loadings* utilizando los datos de calibrado, y luego, en un paso posterior, con la adición de la muestra desconocida, se obtienen los coeficientes de regresión específicos de cada muestra (Figura II.3.B). Ambas maneras implican la participación de la muestra problema en parte del proceso de calibración. En PARAFAC se sigue el primer procedimiento, mientras que en otros métodos, como BLLS/RBL, N-PLS/RBL o U-PLS/RBL se sigue el segundo.

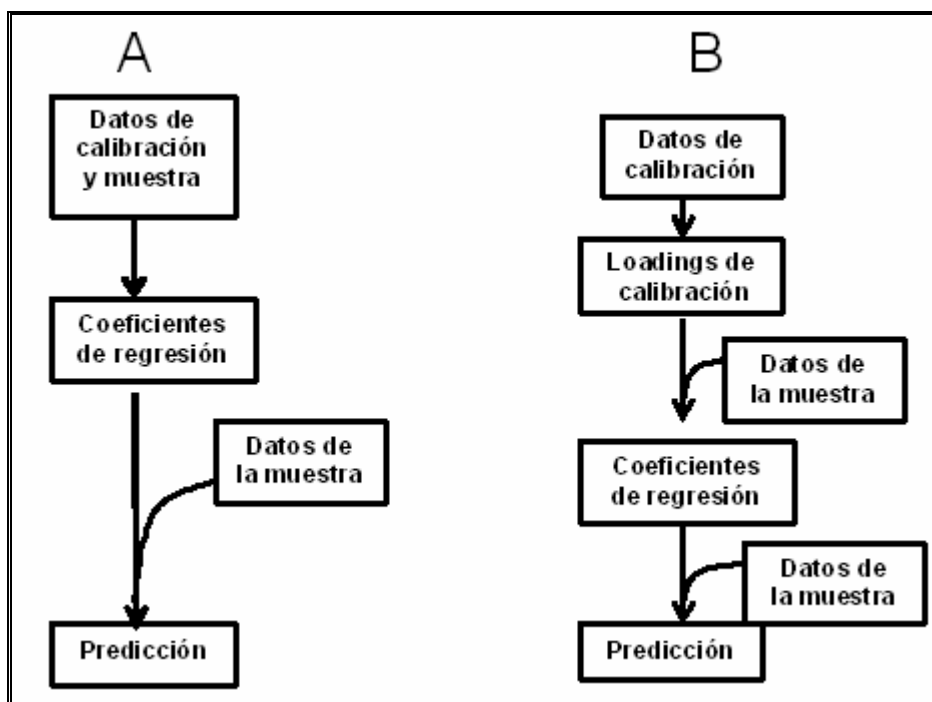


Figura II.3. Dos maneras básicas de obtener la ventaja de segundo orden: A) combinando los datos de calibración con los de la muestra antes de calcular los coeficientes de regresión, B) estimando los loadings a partir de sólo los datos de calibración, y luego calculando los coeficientes de regresión, una vez que la muestra ha sido incorporada.

Antes de comenzar a explicar los métodos de calibración multivariante de segundo orden empleados en esta memoria, es necesario hablar de la posible estructura de los datos de segundo orden empleados, para lo que es necesario introducir el concepto de *trilinealidad*.

Cuando tenemos una matriz de datos  $X$  para un componente puro, ésta puede expresarse, en ausencia de ruido, como el producto de dos vectores:

$$\mathbf{X} = \mathbf{b} \mathbf{c}^T \quad (\text{ec. II.7.})$$

donde  $\mathbf{b}$  y  $\mathbf{c}$  representan los perfiles en ambas dimensiones. Esto ilustra el hecho de que, idealmente,  $\mathbf{b}$  y  $\mathbf{c}$  son independientes entre sí, por lo que este tipo de datos han sido denominados *bilineales* (lineales con una variable cuando la otra se fija y viceversa).

Los métodos de calibración de segundo orden son de gran interés debido a que muchos instrumentos producen datos que siguen un modelo bilineal [2, 59, 60]. Cuando una matriz de datos es bilineal, acoplando varias matrices de datos en la tercera dimensión, se puede llegar a un sistema que satisface el siguiente modelo, si se asume la existencia de un solo componente:

$$\mathbf{X}_{ijk} = a_i b_j c_k \quad (\text{ec. II.8.})$$

donde  $X_{ijk}$  es un elemento del conjunto de datos de tres vías  $\mathbf{X}$  (de tamaño  $I \times J \times K$ );  $a_i$ ,  $b_j$ , y  $c_k$  son elementos correspondientes a los perfiles  $\mathbf{a}$ ,  $\mathbf{b}$  y  $\mathbf{c}$ , que describen el comportamiento de la señal medida en cada una de las dimensiones de datos. En este caso, el conjunto de datos es *trilineal*. Esta condición está relacionada con el hecho de que los datos de segundo orden no son solamente una simple colección de conjuntos de datos de dos vías, sino que existe una relación interna entre cada una de las matrices y, como consecuencia, la descomposición del conjunto de datos de tres vías, construidos con las matrices respuesta medidas para un número de muestras, es única.

Las estructuras de algunos de los modelos que vamos a describir seguidamente son lineales. Es decir, fijando un grupo de parámetros, excepto uno, conduce a un modelo lineal en el parámetro no fijado.

En un determinado modelo se pueden aplicar restricciones. Esto se hace por diversas razones, para identificar al modelo o para asegurar que los parámetros del modelo son razonables, es decir, que están conformes con un conocimiento previo del problema.

Los diferentes métodos multivariantes de segundo orden usados para resolver mezclas multicomponentes pueden dividirse en tres grupos: (a) métodos de solución directa, (b) métodos iterativos y (c) métodos basados en mínimos cuadrados. El primer grupo incluye el método generalizado de reducción de rango (GRAM) [59] y el de descomposición trilineal directo (DTLD) [60]. Ejemplos de métodos iterativos son:

PARAFAC [27], SWATLD [61], N-PLS [62] y el método de resolución multivariada de curvas por mínimos cuadrados alternantes (MCR-ALS) [63]. Mínimos Cuadrados Bilineales (BLLS) es una técnica introducida recientemente por Linder y Sundberg y está basado en un procedimiento directo de mínimos cuadrados [64, 65].

A continuación, describiremos los métodos de calibración multivariante de segundo orden empleados en este trabajo.

#### II.2.2.1. Mínimos cuadrados parciales concatenados (U-PLS)

Una alternativa para trabajar con datos de segundo orden es reorganizarlos en vectores y aplicar algoritmos de primer orden. Así, en el tratamiento de datos de segundo orden, aparece el concepto de *unfolding*.

El término *unfolding*, puede ser traducido como desdoblamiento o simplemente reorganización. Este método consiste en organizar un conjunto de datos multivariantes en una matriz. Se trata de ir concatenando matrices de diferentes niveles, Figura II.4.

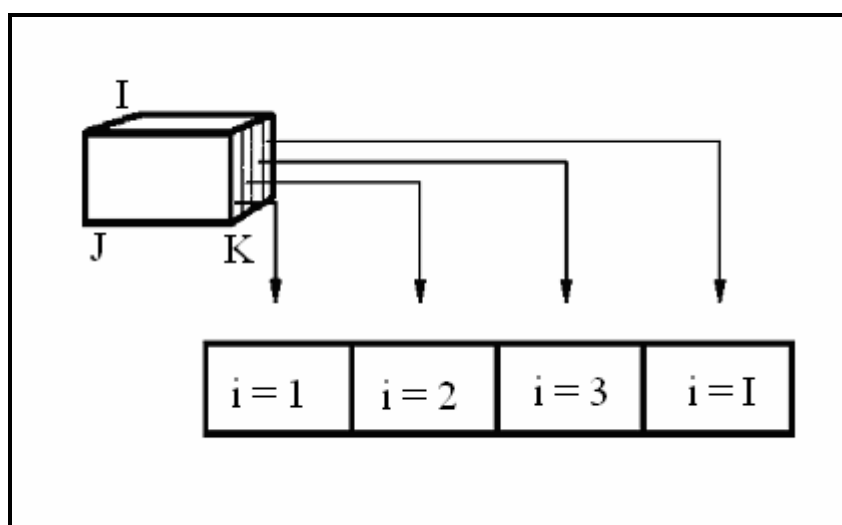


Figura II.4. Representación gráfica del concepto de *unfolding*.



El proceso de unfolding se lleva a cabo principalmente por necesidades computacionales, ya que la forma matricial es la forma más sencilla de introducir datos en una computadora. El objetivo final del desdoblamiento se logra cuando se consigue ignorar la estructura multivariable de los datos, y se tratan como un conjunto de datos de dos vías. Ejemplos de estos métodos son U-PCR (unfolding-principal component regresión) y U-PLS (unfolding-partial least squares) [66].

### II.2.2.2. Mínimos cuadrados parciales multidimensionales (N-PLS)

Anteriormente se ha indicado el fundamento del algoritmo basado en mínimos cuadrados parciales (PLS) para señales de primer orden, pero dicha función puede ser extendida a señales de mayor orden.

Consideramos un modelo en el que, para cada componente, se construye un modelo lineal  $\mathbf{X}$  e  $\mathbf{Y}$ , donde  $\mathbf{X}$  es la matriz de datos e  $\mathbf{Y}$  la matriz de concentraciones. Análogamente a PLS de dos vías, la matriz de datos  $\mathbf{X}$  y la matriz de concentraciones  $\mathbf{Y}$  se pueden descomponer de la forma:

$$\mathbf{X} = \mathbf{T}\mathbf{W}^{\mathbf{K}} \otimes \mathbf{W}^{\mathbf{J}} + \mathbf{E}_{\mathbf{x}} \quad (\text{ec. II.9.})$$

$$\mathbf{Y} = \mathbf{U}\mathbf{Q}^{\mathbf{M}} \otimes \mathbf{Q}^{\mathbf{L}} + \mathbf{E}_{\mathbf{y}} \quad (\text{ec. II.10.})$$

donde  $\otimes$  es el producto de Khatri-Rao.

Al realizar esta descomposición, hay que encontrar los vectores  $\mathbf{w}^{\mathbf{k}}$ ,  $\mathbf{w}^{\mathbf{j}}$ ,  $\mathbf{q}^{\mathbf{L}}$  y  $\mathbf{q}^{\mathbf{M}}$  de modo que los scores  $\mathbf{t}$  y  $\mathbf{u}$  tengan la máxima covarianza con  $\mathbf{y}$ .

De este modo, para un sistema de tres vías, el objetivo del algoritmo es hacer una descomposición del conjunto de datos  $\underline{\mathbf{X}}$  ( $I \times J \times K$ ,  $I$  matrices de datos  $\mathbf{X}$  de tamaño  $J \times K$ ) en triadas. Una triada está formada por un score  $\mathbf{t}$  y dos vectores loadings ponderados; uno en una dimensión,  $\mathbf{w}^{\mathbf{j}}$  (por ejemplo longitudes de onda de emisión) y

otro en otra dimensión,  $\mathbf{w}^K$  (por ejemplo el tiempo). El modelo para un componente de  $\underline{X}$  viene dado por:

$$\hat{x}_{ijk} = t_i w_j^J w_k^K + e_{ijk}; i = 1 \dots I; j = 1 \dots J; k = 1 \dots K \quad (\text{ec. II.11.})$$

donde  $e_{ijk}$  representa el error de la medida.

La ecuación anterior se muestra gráficamente en la Figura II.5.

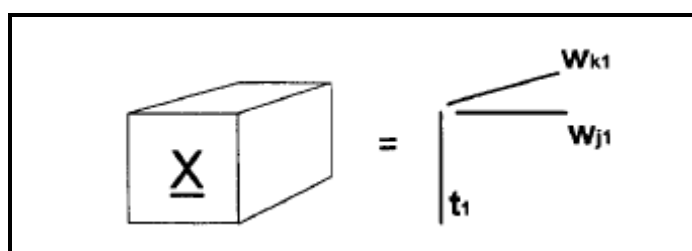


Figura II.5. Representación gráfica del modelo de descomposición trilineal de un componente de  $\underline{X}$ .

Como ya se ha mencionado, el cálculo de los componentes es la parte esencial del algoritmo, y puede ser considerado como un problema de determinación de los vectores loadings ponderados  $\mathbf{w}^J$  y  $\mathbf{w}^K$ , que proporcionen los vectores score  $\mathbf{t}_i$  con máxima covarianza con  $\mathbf{y}$ .

$$\max_{\mathbf{w}^J, \mathbf{w}^K} \left[ \text{cov}(t, y) \left| \min \left( \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J \sum_{k=1}^K (x_{ijk} - t_i w_j^J w_k^K)^2 \right) \right. \right] \quad (\text{ec. II.12.})$$

El procesamiento de datos de órdenes elevados es más difícil que el del caso de datos de dos vías y, al igual que para PLS, el número de factores con N-PLS se determina mediante la validación cruzada y aplicando el criterio de Haaland y Thomas [4, 25].

Comparados con los modelos *unfolding*, los modelos multilineales son mucho más simples porque emplean menos parámetros y son más fáciles de interpretar. Además, los modelos trilineales serán potencialmente menos vulnerables al ruido

debido a que, para realizar la descomposición, se emplea la información en todos los órdenes [62].

Ni U-PLS ni N-PLS presentan la “ventaja de segundo orden”, pero estos algoritmos se han acoplado recientemente a un proceso denominado “bilinealización residual”, RBL [67], que les proporciona esta ventaja para datos de segundo orden [68], como describimos a continuación.

### *II.2.2.3. U-PLS y N-PLS acoplados a RBL*

La teoría del algoritmo U-PLS en combinación con bilinealización residual (RBL) [67] ha sido publicada recientemente [68]. El modelo U-PLS/RBL, constituye un método de calibración multivariante de segundo orden que presenta la “ventaja de segundo orden” [67, 68]. Este método es particularmente interesante debido a que recientes aplicaciones con datos de segundo orden ponen de manifiesto que el algoritmo U-PLS presenta la capacidad de modelar datos que no son estrictamente trilineales, característica que no presentan los algoritmos PARAFAC y BLS/RBL [69-71].

La combinación de N-PLS con RBL fue sugerida por Öhman y Geladi en 1990 [67]. Recientemente, A. Olivieri ha introducido el algoritmo N-PLS combinado con RBL, para datos de segundo orden, en el programa de calibración MVC2 que empleamos en esta memoria y que expondremos posteriormente. Este método aún no ha sido descrito en ningún trabajo, pues está siendo probado en nuestros laboratorios con datos simulados y experimentales, como los expuestos en esta memoria.

En estos métodos, la información de la concentración se emplea en primer lugar durante el paso de calibración, sin incluir los datos de la muestra desconocida, dejando la ventaja de segundo orden para un paso posterior. Esto se muestra en la Figura II.3.B [1].

A continuación, se describen con detalle los modelos U-PLS/RBL y N-PLS/RBL.

➤ *U-PLS/RBL*

Cuando se emplean datos de tres vías con el método U-PLS, la matriz de datos original es transformada en vectores (una dimensión). Ello se consigue desdoblado (unfolding) la información original de la matriz de datos de dos dimensiones. La información de la concentración, se emplea inicialmente en el paso de calibración, en el que no se incluye la muestra desconocida [66].

Las  $I$  matrices de datos de segundo orden de la calibración,  $X_{i,cal}$  (de tamaño  $J \times K$ , donde  $J$  y  $K$  son el número de datos en cada una de las dos dimensiones) son primero vectorizadas mediante el proceso de desdoblamiento (unfolded) en vectores de tamaño  $JK \times 1$ . A continuación, el modelo U-PLS se calibra con estos datos y con el vector  $\mathbf{y}$  ( $I \times 1$ , donde  $I$  es el número de muestras de calibración) de las concentraciones de calibración. Esto nos proporciona un conjunto de vectores directores (*loadings*)  $\mathbf{P}$  y vectores directores ponderados (*weight loadings*)  $\mathbf{W}$  (ambos de tamaño  $JK \times A$ , donde  $A$  es el número de factores necesarios para modelar la matriz de calibración), así como también los coeficientes de regresión  $\mathbf{b}$  (de tamaño  $A \times 1$ ). El parámetro  $A$  puede seleccionarse por técnicas tales como validación cruzada y aplicando el criterio de Haaland y Thomas [4].

Si en las muestras de validación no aparece ningún componente no calibrado,  $\mathbf{b}$  podría ser empleado para estimar la concentración del analito de acuerdo con:

$$y_u = \mathbf{t}_u^T \mathbf{b} \quad (\text{ec. II.13.})$$

donde  $\mathbf{t}_u$  (de tamaño  $A \times 1$ ) es el score de la muestra de validación, obtenido mediante proyección de los datos desdoblados de la muestra de validación  $\text{vec}(\mathbf{X}_u)$  (de tamaño  $JK \times 1$ ) en el espacio de los  $A$  factores:

$$\mathbf{t}_u = (\mathbf{W}^T \mathbf{P})^{-1} \mathbf{W}^T \text{vec}(\mathbf{X}_u) \quad (\text{ec. II.14.})$$

donde  $\text{vec}()$  implica el operador de vectorización. Nótese que PLS es un método de variables latentes, y no requiere en principio información previa, como los espectros o la evolución en el tiempo del analito, para operar con éxito.

Cuando aparecen componentes no calibrados en  $\mathbf{X}_u$ , los scores obtenidos de la ecuación II.14 no son adecuados para predecir la concentración del analito mediante la ecuación II.13. En este caso, los residuos obtenidos en la etapa de predicción mediante U-PLS ( $s_p$ ) serán anormalmente grandes comparados con el ruido instrumental típico.

$$s_p = \|\mathbf{e}_p\| / (JK-A)^{1/2} = \|\text{vec}(\mathbf{X}_u) - \mathbf{P} (\mathbf{W}^T \mathbf{P})^{-1} \mathbf{W}^T \text{vec}(\mathbf{X}_u)\| / (JK-A)^{1/2} = \quad (\text{ec. II.15.}) \\ = \|\text{vec}(\mathbf{X}_u) - \mathbf{P} \mathbf{t}_u\| / (JK-A)^{1/2}$$

donde  $\|\cdot\|$  indica la norma de Euclidiana.

Esta situación puede resolverse por un procedimiento separado llamado bilinealización residual, RBL, el cual ya ha sido descrito en la literatura, y está basado en una descomposición en valores singulares (SVD) para modelar el efecto de los interferentes [68]. RBL intenta minimizar la norma del vector residual  $\mathbf{e}_u$ , calculado durante el ajuste de los datos de la muestra a la suma de las contribuciones relevantes. Para un solo componente inesperado la expresión es la siguiente:

$$\text{vec}(\mathbf{X}_u) = \mathbf{P} \mathbf{t}_u + \text{vec}[g_{\text{int}} \mathbf{b}_{\text{int}} (\mathbf{c}_{\text{int}})^T] + \mathbf{e}_u \quad (\text{ec. II.16.})$$

donde  $\mathbf{b}_{\text{int}}$  y  $\mathbf{c}_{\text{int}}$  son los vectores en las dos dimensiones (ejemplo: emisión-tiempo) de los interferentes de  $\mathbf{E}_p$ , y  $g_{\text{int}}$  es un factor de escala apropiado para el análisis de SVD:

$$(g_{\text{int}}, \mathbf{b}_{\text{int}}, \mathbf{c}_{\text{int}}) = \text{SVD}_1(\mathbf{E}_p) \quad (\text{ec. II.17.})$$

donde  $\mathbf{E}_p$  es la matriz de  $J \times K$  obtenida después de la redistribución del vector  $\mathbf{e}_p$  de  $JK \times 1$  de la ecuación II.15, y  $\text{SVD}_1$  indica el primer componente principal.

Durante el procedimiento de RBL,  $\mathbf{P}$  se mantiene siempre constante a los valores de calibración, y  $\mathbf{t}_u$  varía hasta que  $\|\mathbf{e}_u\|$  se minimiza. La minimización puede ser llevada a cabo utilizando tanto el procedimiento de Gauss-Newton (GN) como también un algoritmo alternante, en ambos casos comenzando con  $\mathbf{t}_u$  de la ecuación II.14. Una vez que  $\|\mathbf{e}_u\|$  se minimiza en la ecuación II.16, las concentraciones del analito son proporcionadas por la ecuación II.13, introduciendo el vector final  $\mathbf{t}_u$  encontrado por el procedimiento de RBL. En todas las aplicaciones realizadas en esta memoria, hemos empleado el procedimiento de GN para lograr la RBL.

El paso crítico para una resolución exitosa por RBL es el hecho de que la solución provista por la minimización es única. Esto puede ser evaluado por el análisis de  $\|\mathbf{e}_u\|$  en función de  $\mathbf{t}_u$ , el cual debería presentar un solo mínimo global, confirmando que el procedimiento de RBL conduce a este mínimo.

El número de componentes no calibrados  $N_{\text{int}}$  puede ser evaluado comparando el residuo final  $s_u$  con el nivel de ruido instrumental:

$$s_u = \|\mathbf{e}_u\| / [JK - (A + N_{\text{int}})]^{1/2} \quad (\text{ec. II.18.})$$

donde  $\mathbf{e}_u$  viene de la ecuación II.16. Una gráfica que represente  $s_u$  frente al número de interferentes, mostraría un decrecimiento del valor de éste, comenzando con un valor  $s_p$  cuando  $N_{\text{int}} = 0$ , hasta estabilizarse con un valor comparable con el del ruido instrumental, permitiendo así localizar el número correcto de interferentes.

➤ *N-PLS/RBL*

Como ya se mencionado, en el método N-PLS, aplicado a datos de segundo orden, la información referente a la concentración de los analitos se introduce en la etapa de calibración sin incluir los datos de la muestra desconocida. Las matrices de datos de las  $I$  muestras de calibración, junto con el vector de concentraciones  $\mathbf{y}$  (de tamaño  $I \times 1$ ) se emplean para obtener las matrices de loadings  $\mathbf{W}^j$  y  $\mathbf{W}^k$  (de tamaños  $J \times A$  y  $K \times A$ , siendo  $A$  el número de factores), así como los coeficientes de regresión  $\mathbf{b}$  (de tamaño  $A \times 1$ ) [72]. El número de factores  $A$  puede seleccionarse utilizando la técnica de validación cruzada [4].

Al igual que ocurría con el algoritmo U-PLS, en ausencia de interferencias,  $\mathbf{b}$  puede emplearse para estimar la concentración del analito calibrado en la muestra desconocida, de acuerdo a:

$$y_u = \mathbf{t}_u^T \mathbf{b} \quad (\text{ec. II.19.})$$

donde  $\mathbf{t}_u$  (de tamaño  $A \times 1$ ) es el vector score de la muestra desconocida, obtenido mediante la adecuada proyección del conjunto de datos sobre las matrices loadings de calibración.

Cuando aparecen componentes no calibrados en la muestra desconocida, los scores obtenidos no son adecuados para predecir la concentración del analito mediante la ecuación II.19. En este caso, los residuos que se obtienen en la etapa de predicción mediante N-PLS ( $s_p$ , ecuación II.20.) serán anormalmente grandes comparados con el nivel de ruido instrumental:

$$s_p = \|\mathbf{e}_p\| / (JK-A)^{1/2} = \|\text{vec}(\mathbf{X}_u) - \text{vec}(\hat{X}_u)\| / (JK-A)^{1/2} \quad (\text{ec. II.20.})$$

donde  $\hat{X}_u$  es un elemento de la matriz de datos de la muestra desconocida ( $\mathbf{X}_u$ ) reconstruida mediante el modelo N-PSL. Por lo tanto, cuando esto ocurre y se requiere

la ventaja de segundo orden debido a la presencia de interferencias en la muestra desconocida, puede aplicarse el procedimiento de bilinealización residual, RBL. Este procedimiento, minimiza los residuos y estima los perfiles de los interferentes.

Durante el procedimiento RBL, los loadings de ponderación (weight loadings)  $\mathbf{W}^j$  y  $\mathbf{W}^k$  se mantienen constantes e iguales a los valores obtenidos en la calibración y  $\mathbf{t}_u$  se varía hasta que los residuos se minimizan. El nuevo vector  $\mathbf{t}_u$  obtenido permite predecir la concentración del analito mediante la ecuación II.19.

Como se mencionó en el apartado anterior, el número de componentes no calibrados puede evaluarse comparando el residuo final con el nivel de ruido instrumental.

#### II.2.2.4. *Análisis factorial paralelo (PARAFAC)*

PARAFAC (PARAllel FACtor análisis) es un método de descomposición que puede ser comparado con el modelo bilineal PCA. Fue propuesto de forma independiente en 1970 por Harshman [73] y por Carroll y Chang [74], quienes renombraron a este modelo como CANDECOMP (Canonical Decomposition). Inicialmente surge como un método de análisis multivariante en el campo de la psicometría.

Para el caso del análisis de datos de tres vías (o datos de segundo orden), la descomposición de datos se hace en triadas o componentes trilineales. En lugar de un vector loading y un score, como en PCA, cada componente consiste en un vector score y dos vectores loading.

En este método, los datos que corresponden a la calibración son las  $I$  matrices  $\mathbf{X}_{i,cal}$  y, por cada muestra desconocida, la matriz  $\mathbf{X}_u$ . Éstas pueden ser “apiladas” para formar una matriz tridimensional  $\underline{\mathbf{X}}$ . Si las matrices individuales son de un tamaño de



$J \times K$ , tales como matrices de evolución de los espectros emisión-tiempo (donde  $J$  = número de longitudes de onda de emisión y  $K$  = número de datos temporales), las dimensiones de  $\underline{\mathbf{X}}$  son  $(I+1) \times J \times K$  ( $I$  = número de muestras de calibración).

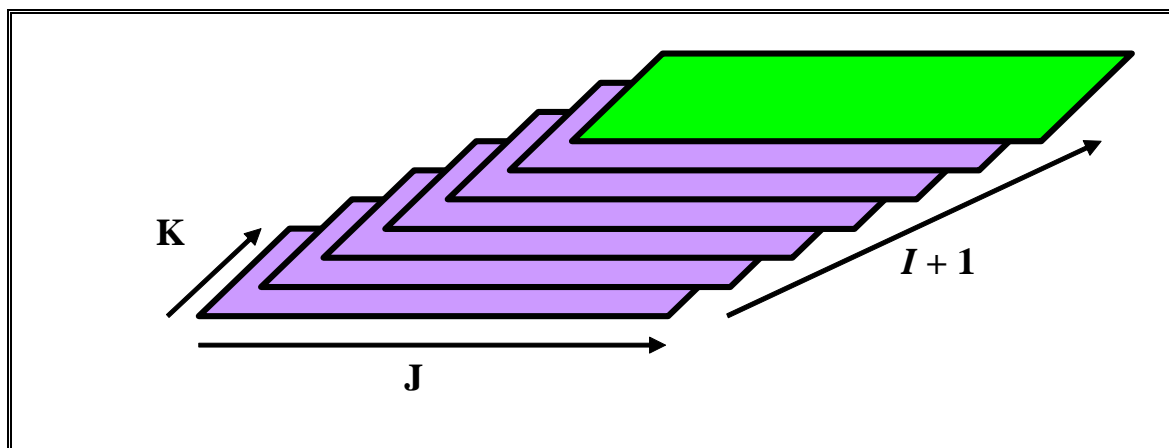


Figura III.1. Esquema representativo de cómo PARAFAC ubica las matrices de datos para procesarlas.

En el modelo de PARAFAC se define un elemento genérico  $\underline{X}_{ijk}$  para la matriz  $\underline{\mathbf{X}}$  como:

$$\underline{X}_{ijk} = \sum_{n=1}^N a_{ni} b_{nj} c_{nk} + \underline{E}_{ijk} \quad (\text{ec. II.21.})$$

donde  $N$  es el número total de componentes químicos que produce la respuesta o señal,  $\underline{E}_{ijk}$  es un elemento del error residual de la matriz  $\underline{\mathbf{E}}$  (con las mismas dimensiones que  $\underline{\mathbf{X}}$ ),  $a_{ni}$ ,  $b_{nj}$  y  $c_{nk}$  son los elementos de los vectores columna  $\mathbf{a}_n$ ,  $\mathbf{b}_n$  y  $\mathbf{c}_n$ , los cuales corresponden a: las concentraciones relativas  $[(I+1) \times 1]$ , los perfiles de emisión  $(J \times 1)$  y los perfiles temporales  $(K \times 1)$ , para cada uno de los  $N$  componentes, respectivamente. Los vectores columna  $\mathbf{a}_n$ ,  $\mathbf{b}_n$  y  $\mathbf{c}_n$  se recogen en la matriz de los *scores*  $\mathbf{A}$  (conteniendo las concentraciones relativas de los componentes), y las matrices de los *loadings*  $\mathbf{B}$  y  $\mathbf{C}$  (con las columnas normalizadas a la unidad). La descomposición de  $\underline{\mathbf{X}}$  suministra los *loadings* y los *scores* de los componentes individuales en todas las mezclas, sean químicamente conocidos o no, constituyendo la base para la aplicación de la ventaja de

segundo orden. Nótese que este modo de operar de PARAFAC implica que consigue esta ventaja en la manera descrita en la Figura II.3.A.

➤ *Optimización del número de factores*

Uno de los principales inconvenientes que se pueden encontrar en PARAFAC, es la selección del adecuado número de factores o componentes,  $N$ . De manera que la aplicación de PARAFAC no es sencilla. Existen diversos métodos para efectuar esa selección pero, debido a la complejidad del problema, ninguno de ellos puede garantizar los resultados en todas las circunstancias. De este modo, el desarrollo de algoritmos en los que no sea necesario establecer de forma exacta el número de factores, es un reto actual de la Quimiometría.

Uno de estos métodos es el denominado *diagnóstico de la consistencia del modelo* o bien en su terminología inglesa aceptada “*Core Consistency Diagnostic*, CORCONDIA,” [75] que se aplica al análisis multivariante de tres vías, especialmente a PARAFAC, y será el método que emplearemos en nuestro estudio. La expresión para este parámetro será:

$$Core\ consistency = 100 \left[ \frac{1 - \sum_{d=1}^F \sum_{e=1}^F \sum_{f=1}^F (g_{def} - t_{def})^2}{\sum_{d=1}^F \sum_{e=1}^F \sum_{f=1}^F t_{def}^2} \right]$$

siendo  $\mathbf{g}$  la denominada superdiagonalidad y  $\mathbf{t}$  la denominada superidentidad

Si el modelo optimizado PARAFAC es válido, entonces  $\mathbf{g}$  se aproxima a  $\mathbf{t}$ . Si los datos no se aproximan al modelo, entonces se obtendrá una diferencia sustancial entre  $\mathbf{g}$  y  $\mathbf{t}$ . La diferencia entre ambas debe ser normalmente pequeña para un modelo.

Desde un punto de vista práctico, si a un grupo de datos modelados mediante PARAFAC se le incrementa de forma progresiva el número de componentes, la superidentidad normalmente disminuye de forma progresiva. Después de aplicar el número máximo de factores apropiados para el modelo, e incluir uno más, la superidentidad disminuye de forma drástica, y a menudo se genera un abrupto corte cuando se emplean representaciones del valor del “core” en función del número de factores. De esta forma, el número de componentes ideales para el modelo será el anterior al que genera el salto brusco en el valor del “core”. Así, cuando el valor del Core Consistency baja desde un valor alto, por encima aproximadamente del 60 % (e incluso cerca del 100%), hasta valores muy pequeños, incluso próximos a 0.1, esto indica que se ha llegado al número apropiado de factores.

Otra manera de seleccionar el número de factores es el análisis de los errores de regresión de la calibración lineal pseudo-univariante [39].

Otro de los inconvenientes que presenta PARAFAC, es que la velocidad con la que se alcanza la convergencia no es elevada [76], ya que es necesario un gran número de iteraciones antes de conseguir la convergencia. El conjunto de datos analíticos necesarios para realizar un estudio de calibración de segundo orden es extremadamente extenso y, generalmente, entre ellos aparecen ligeras multicolinearidades. Todo ello provoca que PARAFAC requiera un elevado número de iteraciones para converger. De modo que el gran tamaño de los datos empleados hace que cada iteración suponga un elevado coste computacional. En la bibliografía se han propuesto diferentes métodos que intentan evitar este aspecto negativo de PARAFAC, empleando técnicas que tratan de obtener los parámetros del modelo empleando matrices de datos más reducidas y, de este modo, se trata de disminuir el tiempo de computación. Por ejemplo, Andersson y Bro [77] propusieron una poderosa herramienta para comprimir datos de enorme tamaño empleando el algoritmo Tucker3 [78]. Por otro lado, existen otros métodos que intentan acelerar el tiempo de cálculo, mediante la reducción del número de iteraciones y, a pesar de que este conjunto de métodos incorporan ventajas respecto a PARAFAC,

aún se requiere la estimación de forma exacta del número de factores, que es la principal limitación.

Con el método denominado SWATLD [61], como comentaremos más adelante, se solventan estos dos inconvenientes. Por un lado, este algoritmo se hace más insensible a un excesivo número de factores y, por otro, se reduce de forma importante el número de iteraciones.

### ***Unicidad***

Una ventaja importante del modelo PARAFAC viene dada por el hecho de que las soluciones que propone a un determinado problema son únicas. En los modelos bilineales existe el problema de la libertad rotacional. En una descomposición espectral en un modelo bilineal, los vectores loading muestran los espectros puros de los analitos medidos. Ahora bien, si se carece de una información externa, no es posible encontrar estos espectros puros, debido a los problemas rotacionales mencionados. En PARAFAC no encontramos estos problemas que surgen en los modelos bilineales, ya que, en la mayoría de los casos, el modelo es único, y esto significa, matemáticamente, que el modelo estimado por PARAFAC no puede rotar sin pérdida de ajuste, al contrario que en los modelos bilineales, donde los scores y loadings pueden rotar sin que cambie el ajuste del modelo.

#### *II.2.2.5. Aspectos relacionados con las características de PLS, N-PLS y PARAFAC*

Todos los algoritmos indicados para análisis multivariante son aplicables a diversos tipos de señales ópticas, eléctricas, cinéticas, cromatográficas, etc. Sin embargo, mientras que PLS utiliza datos de primer orden para llevar cabo los cálculos, N-PLS y PARAFAC emplean datos de segundo orden o más, es decir de tres vías o

más. Dichos datos podrían ser los obtenidos a partir de las matrices de excitación-emisión, en el caso de la fluorescencia, o aquellos que derivan de la utilización como tercera vía de la variable tiempo, pudiendo tratarse tanto de fluorescencia, como absorción u otras señales apropiadas. Sin embargo, aunque N-PLS y PARAFAC aprovechan la mayor información espectral y, por tanto, la mayor capacidad diferenciadora de los datos de segundo orden, presentan características distintas que les confieren diferentes capacidades de resolución y, por tanto, diversos campos de actuación.

N-PLS, utiliza señales de tres vías o más, y construye la matriz de calibración mediante mezclas de componentes puros como patrones. Tiene la ventaja frente a PARAFAC de, potencialmente, poder modelar no linealidades y ser más rápido en la construcción del modelo. Sin embargo, cuando se aplica a la resolución de componentes en presencia de un fondo que presenta amplia señal y gran variabilidad, por ejemplo, suero u orina en diversos individuos, la única posibilidad es incorporar, a la matriz de calibrado, numerosas muestras de suero u orina, si se dispone de ellas, en ausencia de los analitos de interés. Esta forma de actuación tiene la limitación de que nunca realmente se está disponiendo del fondo, o interferencia, real, que incluso en algunos casos no se puede disponer de ella y que el número de muestras fondo necesario para poder aproximarnos a una modelación de dicha interferencia es enorme, en muchos casos 50 o más. Por tanto, N-PLS previsiblemente podrá ser aplicado favorablemente cuando el fondo sea conocido y constante. Este hecho puede ocurrir, por ejemplo, cuando se pretende su aplicación al análisis de rutina de productos manufacturados de composición previsible y compleja. En estos casos, la optimización de un modelo con la elevada capacidad de resolución y la rapidez de predicción de N-PLS, puede generar procedimientos competitivos incluso con HPLC, de forma similar a como lo hace PLS para sistemas más simples.

Otra ventaja de N-PLS frente a PARAFAC es la incorporación de las variables dependientes en la descomposición de las variables independientes, lo que podría estabilizar el modelo predictivo [62].

En cuanto a PARAFAC, presenta como limitación fundamental que los datos tengan que ser lineales. En cuanto a la velocidad de predicción de las muestras es más lento que PLS, pero este hecho, por otra parte, deriva de lo que podríamos considerar su mayor virtud, la denominada “*ventaja de segundo orden*”.

PARAFAC utiliza para la calibración las mezclas patrón de los componentes de interés pero, además, incluye una a una las muestras problema. De manera que, a través de la información obtenida, discrimina entre la información correspondiente a los componentes de interés, contenidos en los patrones, y el resto de la información presente en la muestra problema, que trata como interferencia. Esta forma de operar, aunque hace que el proceso sea más lento, nos asegura que el fondo de la muestra está siendo modelado.

#### *II.2.2.6. Descomposición trilineal alternada autoponderada (SWATLD)*

Este algoritmo de descomposición trilineal fue propuesto por Chen y col. [61] y es un algoritmo similar a ATLD (Alternating Trilinear Decomposition) [79]. El cálculo mediante SWATLD (Self-weighted Alternating Trilinear Decomposition) se caracteriza por su rapidez de convergencia y por el hecho de que el uso de un excesivo número de factores no afecta al proceso de calibración, de modo que, si se emplea un número de factores superior al número de factores óptimo, se llega a soluciones reales y no a combinaciones lineales de las mismas. Por consiguiente, el algoritmo empleado en esta metodología es más eficaz que el usado en PARAFAC y, desde un punto de vista práctico, emplea un tiempo más corto de análisis. Tan sólo el empleo de un número de factores extremadamente elevado, puede conducir a resultados no reales.

Este método, con el objetivo de incrementar la velocidad de convergencia, utiliza un algoritmo alternativo para la descomposición trilineal del cubo de datos, empleando un método de optimización alternante de un conjunto de tres funciones objetivo, a diferencia de una única empleada por PARAFAC. La razón que esgrimen

estos autores, para la utilización de estas tres funciones, radica en que están intrínsecamente relacionadas entre sí.

### II.2.2.7. Mínimos cuadrados bilineales (BLLS)

El método BLLS (Bilinear least squares), introducido por Linder y Sundberg, se describe en detalle en los dos trabajos originales que lo desarrollan [64, 65].

Empleando BLLS no es necesario identificar los componentes calibrados, ya que lo hace el algoritmo automáticamente y, al igual que PARAFAC y SWATLD, la metodología BLLS supone una calibración para cada problema que se pretende analizar, es decir, en esta metodología no existe la etapa previa de calibrado con patrones, sino que todo ello se realiza cada vez que se pretende aplicar el método.

A diferencia de PARAFAC, en el método BLLS, la información referente a la concentración se introduce durante la etapa de calibración, sin incluir datos de la muestra desconocida, con objeto de obtener aproximaciones a las matrices de los analitos puros ( $\mathbf{S}_n$ ) a concentración unidad. Para ello se siguen los siguientes pasos: (1) se obtienen las matrices de concentración ponderadas  $\mathbf{T}_n$  (del tamaño de las matrices de datos de calibración,  $J \times K$ ), (2) se calcula la matriz producto de concentraciones  $\mathbf{D}$ , de tamaño  $N_{\text{cal}} \times N_{\text{cal}}$ , donde  $N_{\text{cal}}$  es el número de analitos calibrados y (3) se estima  $\mathbf{S}_n$  a partir de  $\mathbf{D}$  y de las  $N_{\text{cal}}$  matrices  $\mathbf{T}_n$ .

$$\mathbf{T}_n = \sum_{i=1}^I Y_{in} \mathbf{X}_{i,\text{cal}} \quad (\text{ec. II.22.})$$

$$\mathbf{D} = \mathbf{Y}^T \mathbf{Y} \quad (\text{ec. II.23.})$$

$$\mathbf{S}_n = \sum_{n'=1}^N (D^{-1})_{nn'} \mathbf{T}_{n'} \quad (\text{ec. II.24.})$$

donde  $\mathbf{Y}$  es una matriz de tamaño  $I \times N_{\text{cal}}$ , que contiene las concentraciones de los  $N_{\text{cal}}$  analitos calibrados en las  $I$  muestras.

Las matrices  $\mathbf{S}_n$  ( $J \times K$ ) permiten la estimación de los perfiles espectrales de los analitos calibrados. Para ello, se han propuesto dos procedimientos: el estimador de perfiles BLLS y el estimador de perfiles basado en la descomposición en los valores singulares (SVD), siendo éste último el recomendado [64, 65]. Para ello, se calcula el componente individual SVD, de cada  $\mathbf{S}_n$  ( $\text{SVD}_1$ ):

$$(\mathbf{b}_n \mathbf{g}_n \mathbf{c}_n) = \text{SVD}_1(\mathbf{S}_n) \quad (\text{ec. II.25.})$$

donde  $\mathbf{b}_n$  y  $\mathbf{c}_n$  son los perfiles de emisión ( $J \times 1$ ) y de tiempo ( $K \times 1$ ) de la matriz de datos del componente  $n$ ,  $\mathbf{S}_n$ , y  $\mathbf{g}_n$  es el primer valor singular. Los perfiles espectrales obtenidos para todos los analitos se juntan en las matrices directoras (loadings) de calibración  $\mathbf{B}_{\text{cal}}$  y  $\mathbf{C}_{\text{cal}}$ , de manera similar a PARAFAC, excepto que no incluyen posibles componentes adicionales que pueden aparecer en la muestra desconocida.

Si el modelo de calibración es exacto, las matrices directoras (loadings)  $\mathbf{B}_{\text{cal}}$  y  $\mathbf{C}_{\text{cal}}$  pueden emplearse para estimar la concentración de los analitos en muestras desconocidas. El procedimiento de predicción emplea mínimos cuadrados.

La matriz del analito puro en la calibración,  $\mathbf{S}_{\text{cal}}$  (de dimensiones  $JKL \times N_{\text{cal}}$ ), puede definirse en BLLS como:

$$\mathbf{S}_{\text{cal}} = [\mathbf{g}_1 (\mathbf{c}_1 \otimes \mathbf{b}_1) \mid \mathbf{g}_2 (\mathbf{c}_2 \otimes \mathbf{b}_2) \mid \dots \mid \mathbf{g}_{N_{\text{cal}}} (\mathbf{c}_{N_{\text{cal}}} \otimes \mathbf{b}_{N_{\text{cal}}})] \quad (\text{ec. II.26.})$$

donde  $\otimes$  es el producto de Kronecker, lo cual conduce a la siguiente ecuación de predicción para BLLS:

$$\mathbf{y}_u = \mathbf{S}_{\text{cal}}^+ \text{vec}(\mathbf{X}_u) \quad (\text{ec. II.27.})$$



donde  $\mathbf{y}_u$  es un vector (de tamaño  $N_{\text{cal}} \times 1$ ) que contiene la concentración predicha de los  $N_{\text{cal}}$  analitos de la muestra problema.

La existencia de compuestos no modelados, en una muestra desconocida, se estudia mediante comparación de los residuos del ajuste por mínimos cuadrados de la predicción ( $s_p$ ) [64, 65], con el nivel de ruido instrumental.

$$s_p = \|\text{vec}(\mathbf{E}_p)\| / (JK - N_{\text{cal}})^{1/2} = \|\text{vec}(\mathbf{X}_u) - \mathbf{S}_{\text{cal}} \mathbf{y}_u\| / (JK - N_{\text{cal}})^{1/2} \quad (\text{ec. II.28.})$$

Dicho nivel de ruido se calcula con facilidad haciendo medidas repetidas del blanco.

Si se encuentran componentes no modelados, se realiza un procedimiento iterativo separado, que se denomina bilinealización residual (RBL) [65], que consiste en estimar los perfiles de los interferentes mediante un procedimiento que implica la minimización de la matriz de residuos  $\mathbf{E}_u$ , según las siguientes etapas:

(1).- Tomamos  $N_{\text{int}} = 1$  como el número de componentes interferentes que contiene la muestra desconocida.

(2).- Se calcula  $\mathbf{y}_u$  con la ecuación II.28 y la matriz  $\mathbf{E}_u$  de los errores residuales de la etapa de predicción con la ecuación II.30. La primera vez que se utiliza este procedimiento RBL, se toma,  $\mathbf{B} = \mathbf{B}_{\text{cal}}$  y  $\mathbf{C} = \mathbf{C}_{\text{cal}}$ :

$$\mathbf{y}_u = [(\mathbf{B}^T \mathbf{B})^{-1} * (\mathbf{C}^T \mathbf{C})]^{-1} \mathbf{G} \text{Diag}(\mathbf{B}^T \mathbf{X}_u \mathbf{C}) \quad (\text{ec. II.29.})$$

$$\mathbf{E}_u = | \mathbf{X}_u - \mathbf{B} \mathbf{Y}_u \mathbf{C}^T | \quad (\text{ec. II.30.})$$

donde  $\mathbf{Y}_u$  es una matriz diagonal cuyos elementos en la diagonal son los elementos del vector  $\mathbf{y}_u$  y el resto de elementos son ceros,  $\mathbf{G}$  es también una matriz diagonal  $N_{\text{cal}} \times N_{\text{cal}}$

cuyos elementos en la diagonal son los valores de  $g_n$  en la ecuación II.25 y “Diag” convierte la principal diagonal de la matriz  $N_{\text{cal}} \times N_{\text{cal}}$  ( $\mathbf{B}^T \mathbf{X}_u \mathbf{C}$ ) en el vector  $N_{\text{cal}} \times 1$ .

(3).- Se realiza el procedimiento de descomposición en valores singulares (SVD) con los  $N_{\text{int}}$  componentes de la matriz  $\mathbf{E}_u$ , y se obtienen los perfiles de la o las interferencias:

$$\mathbf{B}_{\text{int}} \mathbf{G}_{\text{int}} \mathbf{C}_{\text{int}}^T = \text{SVD}_{N_{\text{int}}}(\mathbf{E}_u) \quad (\text{ec. II.31.})$$

(4).- Se expanden los perfiles para incluir  $\mathbf{B}_{\text{int}}$  y  $\mathbf{C}_{\text{int}}$ :

$$\mathbf{B} = [\mathbf{B}_{\text{cal}} \mid \mathbf{B}_{\text{int}}] \quad (\text{ec. II.32.})$$

$$\mathbf{C} = [\mathbf{C}_{\text{cal}} \mid \mathbf{C}_{\text{int}}] \quad (\text{ec. II.33.})$$

(5).- Se vuelve a la etapa 2 y se continua hasta llegar a la convergencia.

(6).- Si los residuos son todavía significativamente mayores que el nivel de ruido, volver a la etapa 1 e incrementar el número de interferentes en una unidad. Nótese que el valor final de  $N$  en BLLS vendrá dado por  $N_{\text{cal}} + N_{\text{int}}$ .

En resumen, la idea principal de BLLS es realizar un procedimiento de calibración-predicción en dos etapas, en el cual la predicción de las concentraciones se realiza mediante mínimos cuadrados. La “ventaja de segundo orden” se utiliza en una etapa posterior, en la cual los residuos de la matriz se bilinearizan para estimar los perfiles de las interferencias. Esta última etapa sirve para expandir los vectores directores (loadings) y para estimar correctamente las concentraciones del analito, aun en presencia de constituyentes no modelados. El modo de aprovechar la ventaja de segundo orden, es el indicado en la Figura II.3..B.

➤ *Optimización del número óptimo de factores*

El número de factores en BLLS, puede estimarse comparando el valor del residuo final  $s_u$  del ajuste lineal de las predicciones del modelo, con el nivel de ruido instrumental, donde:

$$s_u = \|\text{vec}(\mathbf{E}_u)\| / [JK - (N_{\text{cal}} + N_{\text{int}})]^{1/2} \quad (\text{ec. II.34.})$$

donde  $\mathbf{E}_u$  se calcula según la ecuación II.30. Si representamos gráficamente el valor de  $s_u$  frente al número de componentes, se encuentra un decrecimiento en el valor de  $s_u$ , comenzando en un valor  $s_p$ , cuando  $N_{\text{int}} = 0$ , hasta que el valor de  $s_u$  se estabiliza con un valor compatible con el ruido instrumental, permitiendo esto elegir el número correcto de factores.

### II.2.3. *Calibración multivariante de tercer orden*

En teoría, la utilización de datos con una estructura dimensional mayor, 4 vías o tercer orden, aportará métodos que sean aún más robustos frente a la presencia de interferencias y a los efectos de matriz. Los datos de cuatro vías ofrecen la posibilidad de introducir una dimensión adicional al conjunto de datos de tres vías, permitiendo un incremento teórico de la selectividad.

Hasta la fecha, se han realizado muy pocas experiencias con datos de tercer orden, dado que los sistemas susceptibles de generar este tipo de datos son más limitados que los que generan datos de segundo orden. Generalmente, se introduce la evolución en el tiempo de la señal analítica para obtener la tercera dimensión. Por ejemplo, el ácido acetilsalicílico y ascórbico se analizaron usando los datos espectrofotométricos-tiempo-pH que se procesaron con N-PLS, en este caso no fue necesario disponer de la ventaja second-order [80].

En la mayoría de los casos, se ha utilizado el análisis de la evolución con el tiempo de las matrices de excitación-emisión fluorescentes, EEMs, mediante reacciones cinéticas no excesivamente rápidas. En este contexto, Tan y col. emplearon datos de cuatro vías, junto con PARAFAC, en un sistema cinético que implicó la degradación simultánea de las clorofilas a y b, extraídas de espinacas, mediante tratamiento con un tampón ácido [81]. Un problema común para obtener la evolución cinética de EEMs es el tiempo necesario registrar la EEM completa de una muestra. En el caso anterior, la reacción era muy lenta, por lo que no hubo ningún problema para registrar cada EEM.

Nicolajsen y col. [82] emplearon la evolución con el tiempo de las matrices de excitación-emisión fluorescentes, mediante PARAFAC y N-PLS, para cuantificar las catecolaminas adrenalina y noradrenalina. El registro de cada EEM se realizó durante un segundo empleando un fluorímetro equipado con un detector CCD (charged coupled device), descrito previamente por Muroski y col. [83]. En este caso, no fue necesario disponer de la ventaja de segundo orden, aunque los autores informaron de este requisito para el futuro análisis de muestras de orina.

También se determinó fenvalerato empleando la evolución de las EEMs basadas en su reacción de fotólisis junto con PARAFAC, obteniendo muy buenas figuras de mérito [84].

Otros ejemplos de calibración con datos de EEMs de cuatro vías han sido desarrollados por nuestro grupo de investigación para determinar leucovorín y metotrexato en muestras de orina, aplicando PARAFAC, TLLS, una extensión de BLLS para datos de tercer orden y U-PLS [85]. En este caso, se ha utilizado un espectrofluorímetro de barrido rápido comercial para la adquisición de los datos EEM-tiempo. Cada EEM se obtenía en 12 segundos, a una velocidad de registro de longitudes de onda de 24000 nm/min, obteniéndose 10 matrices EEMs en un tiempo de 0 a 10.8 min, con un intervalo de 72 segundos entre el registro de una matriz y la siguiente. Es decir, se tardaban 12 segundos en el registro de una matriz de datos (EEM) y el espectrofluorímetro permanecía parado durante 60 segundos, antes de comenzar el

registro de la siguiente EEM. Estas últimas metodologías propuestas, TLLS y U-PLS, combinadas con el procedimiento separado denominado trilinealización residual (RTL), una extensión de RBL para datos de tercer orden, han demostrado explotar convenientemente la ventaja de segundo orden, permitiendo determinar las concentraciones de los analitos incluso en presencia de un fondo fluorescente inesperado en las muestras problema [86]. Es de esperar que, en un futuro cercano, se incremente este tipo de análisis, en el momento en que estos espectrofluorímetros de barrido rápido comerciales se popularicen.

En esta Memoria se han empleado datos similares para la determinación de ácido fólico y metotrexato en muestras de orina, aplicándose los métodos N-PLS y PARAFAC. Ambos proporcionaron resultados similares, lo que indica que las muestras no presentaron componentes inesperados en este caso en particular [87]. Esta mezcla también se ha resultado en muestras de suero, empleando U-PLS en combinación con RTL [88].

Kim y col. [89] emplearon las EEM de fluorescencia inducida fotoquímicamente junto con PARAFAC. La fotodegradación con el tiempo de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (benzo[*a*]antraceno, benzo[*k*]fluoranteno y dibenzo[*a*, *h*]antraceno) se empleó como dimensión analítica adicional. En este trabajo se demostró que los datos de tercer orden, obtenidos del registro con el tiempo de degradación de las EEMs, presentan mayor selectividad para los hidrocarburos aromáticos policíclicos que los datos de segundo orden, donde se registraron solamente las EEM.

Goicoechea y col. [90] propusieron, por primera vez, emplear PARAFAC con datos obtenidos de las matrices de Shpol'skii a la temperatura del helio líquido. Los datos de tercer orden empleados fueron las matrices fosforescentes de excitación-emisión-tiempo de decaimiento, registradas con la ayuda de una fibra óptica criogenizada, un láser y un sistema multicanal para la detección de la fosforescencia. Estos datos se aplicaron al análisis de 2,3,7,8-tetracloro dibenzo-*p*-dioxina en muestras de agua. La viabilidad para determinar directamente niveles de concentración, del

orden de partes por trillón de este compuesto, se demostró empleando muestras contaminadas de composición desconocida.

Cuando usamos datos de orden mayor que dos, la noción de trilinealidad que hemos empleado con datos de 3 vías, puede extenderse a cuatrilinealidad, etc. La idea básica es la misma, fijando los parámetros en todas las dimensiones menos una, el modelo es lineal en el conjunto de parámetros que no se fijan. Esto se cumple para todos los conjuntos de parámetros.

Los datos de cuatro vías exhibirían en principio las mismas ventajas que los de tres vías, manteniendo la ventaja de segundo orden y aportando una selectividad adicional. Booksh y Kowalski, cuando se refieren a datos de cuatro vías (calibración de tercer orden), sugieren el término de *ventaja de tercer orden* [2], aunque las implicaciones analíticas de este término no se han explorado todavía, es decir, no hay evidencias experimentales que demuestren la existencia de una ventaja adicional, al utilizar datos de 4 vías, respecto al uso de datos de 3 vías. Por ello, aún no se encuentran en la bibliografía referencias a la teórica “ventaja de tercer orden”, aún cuando de manera empírica parece evidente que introducir un parámetro informativo más del sistema, debe conducir a mejoras en el modelo predictivo.

En este apartado, se describe un algoritmo quimiométrico denominado Mínimos Cuadrados Trilineales (TLLS) acoplado con trilinealización residual (RTL) [85, 86], capaz de resolver el problema de componentes no calibrados. El método se desarrolló como una extensión de Mínimos Cuadrados Bilineales (BLLS), acoplado con bilinealización residual (RBL), para el análisis de datos de tercer orden (cuatro vías). También describiremos los algoritmos PARAFAC y la versión de N-PLS para datos de 4 vías, así como los modelos U-PLS y N-PLS combinados con trilinealización residual (RTL).

### II.2.3.1. PARAFAC

Una muestra produce un dato de tercer orden cuando se obtiene una matriz de datos de dimensiones  $J \times K \times L$ , donde  $J$ ,  $K$  y  $L$  denotan el número de datos en cada una de las tres dimensiones. Por ejemplo, en la medida cinética de matrices de excitación-emisión (EEM),  $J$  es el número de longitudes de onda de emisión,  $K$  es el número de longitudes de onda de excitación y  $L$  es el número de datos en el tiempo. Una manera de analizar este tipo de datos es juntando las  $I$  matrices de calibración ( $\mathbf{X}_{i,cal}$ ) y la matriz de la muestra desconocida ( $\mathbf{X}_i$ ) en una matriz de datos de cuatro vías  $\mathbf{X}$ , cuyas dimensiones son  $[(I + 1) \times J \times K \times L]$ .

Si  $\mathbf{X}$  sigue un modelo cuatrilíneo, PARAFAC puede describirse matemáticamente en términos de cuatro vectores para cada componente responsable de la respuesta. Estos cuatro vectores son designados como  $\mathbf{a}_n$ ,  $\mathbf{b}_n$ ,  $\mathbf{c}_n$  y  $\mathbf{d}_n$  y recogen los valores de concentraciones relativas, los perfiles de emisión, los perfiles de excitación y los perfiles de tiempo para el componente  $n$ , respectivamente. La expresión aplicable es [91]:

$$X_{ijkl} = \sum_{n=1}^N a_{in} b_{jn} c_{kn} d_{ln} + E_{ijkl} \quad (\text{ec. II.35.})$$

donde  $N$  es el número total de componentes,  $a_{in}$  es la concentración relativa del componente  $n$  en la muestra  $i$ , y  $b_{jn}$ ,  $c_{kn}$  y  $d_{ln}$  son las intensidades normalizadas de emisión  $j$ , de excitación  $k$ , y tiempo  $l$ , respectivamente. Los valores de  $E_{ijkl}$  son los elementos de la matriz  $\mathbf{E}$ , la cual es un término de error residual de las mismas dimensiones que  $\mathbf{X}$ . Los vectores columnas  $\mathbf{a}_n$ ,  $\mathbf{b}_n$ ,  $\mathbf{c}_n$  y  $\mathbf{d}_n$  se recogen en las correspondientes matrices  $\mathbf{A}$ ,  $\mathbf{B}$ ,  $\mathbf{C}$  y  $\mathbf{D}$  ( $\mathbf{b}_n$ ,  $\mathbf{c}_n$  y  $\mathbf{d}_n$  suelen normalizarse a la unidad).

El modelo descrito por la ecuación II.35 define la descomposición de  $\mathbf{X}$ , que permite conocer los perfiles espectrales ( $\mathbf{B}$  y  $\mathbf{C}$ ), perfiles de tiempo ( $\mathbf{D}$ ) y concentraciones relativas ( $\mathbf{A}$ ), de los componentes individuales en las  $(I+1)$  mezclas, tanto si son químicamente conocidos como si no. Esto constituye la base de la ventaja

de segundo orden. La descomposición se realiza normalmente a través de un esquema de minimización mediante mínimos cuadrados alternos (alternating least-squares, ALS) [27, 72].

Para la aplicación del modelo PARAFAC en calibración multivariante hay que tener en cuenta una serie de etapas que son: 1) establecer el número de factores que provocan respuesta, 2) identificación específica de los componentes a partir de la información que suministra el modelo y 3) calibración del modelo para obtener las concentraciones absolutas para un componente particular, en una muestra desconocida.

El número de factores óptimo se puede estimar por varios métodos, nosotros empleamos el *CORCONDIA*, descrito anteriormente. La identificación de los constituyentes químicos bajo investigación se consigue con la ayuda de los tres perfiles estimados, espectros de emisión, espectros de excitación y perfiles cinéticos, comparando éstos con los de disoluciones patrones del analito de interés. Es necesario hacer esto porque los componentes que se obtienen por descomposición de  $\mathbf{X}$ , se ordenan de acuerdo a su contribución a la varianza espectral y este orden no se mantiene necesariamente cuando se cambia la muestra desconocida.

Las concentraciones absolutas de los analitos se obtienen después de la calibración, porque la descomposición de los datos de cuatro vías sólo provee valores relativos de concentración, que se encuentran contenidos en la matriz  $\mathbf{A}$ . La calibración se realiza por medio de un conjunto de patrones de concentraciones conocidas (contenidas en el vector  $\mathbf{y}$  de dimensiones  $I \times 1$ ) y regresión de los primeros  $I$  elementos de la columna  $\mathbf{a}_n$  frente a  $\mathbf{y}$ :

$$k = \mathbf{y}^+ \times [a_{1n} \mid \dots \mid a_{In}] \quad (\text{ec. II.36.})$$

donde “+” implica calcular la pseudo-inversa. La conversión de concentraciones relativas de  $n$ , a absolutas en la muestra desconocida, se realiza mediante división del último elemento de la columna  $\mathbf{a}_n [a_{(I+1)n}]$  por la pendiente de la gráfica de calibración  $k$ :



$$y_u = a_{(I+1)_n} / k \quad (\text{ec. II.37.})$$

### II.2.3.2. Mínimos cuadrados trilineales (TLLS)

El método de tercer orden TLLS (Trilinear least squares) es una extensión del método de segundo orden BLLS, para datos de 4 vías, propuesto por nuestro grupo de investigación [85, 86]. Igual que en PARAFAC, se requiere un conjunto de calibración compuesto de  $I$  mezclas de los  $N_{\text{cal}}$  analitos. Sin embargo, a diferencia de PARAFAC, la información sobre la concentración del analito se introduce en TLLS en la etapa de calibración sin incluir la muestra desconocida.

Al igual que en BLLS, TLLS asume que los datos siguen una estructura trilineal y se obtienen aproximaciones a las matrices del analito puro,  $\underline{\mathbf{S}}_n$  (de tamaño  $J \times K \times L$ ), a concentración unidad. Éstas se calculan mediante los siguientes pasos: (1) se obtienen las matrices de concentración ponderadas,  $\underline{\mathbf{T}}_n$ , de tamaño  $J \times K \times L$ , (2) se calcula la matriz de productos de concentraciones,  $\mathbf{D}$ , de tamaño  $N_{\text{cal}} \times N_{\text{cal}}$ , y (3) se estiman las matrices  $\mathbf{S}_n$  a partir de  $\mathbf{D}$  y las  $N_{\text{cal}}$  matrices  $\underline{\mathbf{T}}_n$ .

Las matrices  $\underline{\mathbf{S}}_n$  (de tamaño  $J \times K \times L$ ) obtenidas, permiten la estimación de los perfiles de los analitos calibrados. El procedimiento empleado, ya discutido para BLLS, se denomina estimador de perfiles SVD (descomposición en valores singulares) y se puede extender a una dimensión más mediante el operador Tucker3 a cada una de las matrices  $\underline{\mathbf{S}}_n$  [64, 65], que es análogo al modelo PARAFAC de tercer orden para cada  $\underline{\mathbf{S}}_n$  [85].

$$S_{n,jkl} = g_n b_{jn} c_{kn} d_{ln} + E_{n,jkl} \quad (\text{ec. II.38.})$$

donde  $S_{n,jkl}$  es un elemento (j,k,l) de  $\mathbf{S}_n$ ,  $g_n$  es el núcleo de normalización,  $b_{jn}$ ,  $c_{kn}$  y  $d_{ln}$  son elementos de  $\mathbf{b}_n$ ,  $\mathbf{c}_n$  y  $\mathbf{d}_n$  que recogen los valores de los perfiles de emisión ( $J \times I$ ), los

perfiles de excitación ( $K \times I$ ) y los perfiles de tiempo ( $L \times 1$ ) para el componente  $n$ , respectivamente y  $E_{n,jkl}$  es un elemento del término residual  $\underline{\mathbf{E}}_n$  (de las mismas dimensiones que  $\underline{\mathbf{S}}_n$ ). Los perfiles obtenidos de la ecuación II.38 son similares a los descritos mediante PARAFAC; sin embargo, éstos no incluyen los componentes no calibrados. A diferencia de PARAFAC, en TLLS no es necesario identificar los componentes calibrados, ya que esto lo realiza el algoritmo automáticamente.

Si el modelo de calibración es exacto, la matriz del analito puro,  $\underline{\mathbf{S}}_n$ , permite estimar la concentración del analito en la muestra desconocida. Así, análogamente a BLLS, la matriz del analito puro en la calibración,  $\mathbf{S}_{\text{cal}}$  (de dimensiones  $JKL \times N_{\text{cal}}$ ), puede definirse en TLLS como:

$$\mathbf{S}_{\text{cal}} = [g_1 (\mathbf{d}_1 \otimes \mathbf{c}_1 \otimes \mathbf{b}_1) \mid g_2 (\mathbf{d}_2 \otimes \mathbf{c}_2 \otimes \mathbf{b}_2) \mid \dots \mid g_{N_{\text{cal}}} (\mathbf{d}_{N_{\text{cal}}} \otimes \mathbf{c}_{N_{\text{cal}}} \otimes \mathbf{b}_{N_{\text{cal}}})] \quad (\text{ec. II.39.})$$

donde  $\otimes$  es el producto de Kronecker, lo cual conduce a la siguiente ecuación de predicción para TLLS:

$$\mathbf{y}_u = \mathbf{S}_{\text{cal}}^+ \text{vec}(\underline{\mathbf{X}}_u) \quad (\text{ec. II.40.})$$

donde  $\mathbf{y}_u$  es un vector (de tamaño  $N_{\text{cal}} \times 1$ ) que contiene la concentración predicha de los  $N_{\text{cal}}$  analitos de la muestra problema.

Cuando en la matriz  $\underline{\mathbf{X}}_u$  aparecen componentes no calibrados, la ecuación II.40 no sirve para la predicción del analito. En este caso, los residuos del procedimiento de predicción de TLLS,  $s_p$ , serán anormalmente grandes comparados con el ruido instrumental típico (éste último, como ya dijimos, puede conocerse fácilmente mediante medidas de réplicas del blanco):

$$s_p = \|\text{vec}(\underline{\mathbf{E}}_p)\| / (JKL - N_{\text{cal}})^{1/2} = \|\text{vec}(\underline{\mathbf{X}}_u) - \mathbf{S}_{\text{cal}} \mathbf{y}_u\| / (JKL - N_{\text{cal}})^{1/2} \quad (\text{ec. II.41.})$$

Si aparece una interferencia en la muestra desconocida, se aplica un procedimiento iterativo separado, llamado trilinealización residual, RTL. Consiste en la estimación de los perfiles de los interferentes  $\mathbf{b}_{int}$ ,  $\mathbf{c}_{int}$  y  $\mathbf{d}_{int}$ , por un procedimiento que involucra la minimización de la matriz de los residuos  $\mathbf{E}_u$ , calculados cuando se ajustan los datos de la muestra a la suma de las contribuciones de los componentes:

$$\mathbf{X}_u = \sum_{n'=1}^{N_c} \mathbf{S}_{n'} y_{n',u} + \mathbf{X}_{int} + \mathbf{E}_u \quad (\text{ec. II.42.})$$

donde  $\mathbf{X}_{int}$  es la señal de la interferencia reconstruida usando el modelo Tucker3.

Durante la minimización, los perfiles de la interferencia se estiman por el análisis Tucker3 de la matriz residual  $\mathbf{E}_p$  mostrada en la ecuación II.41, usando el primer componente principal:

$$(\mathbf{g}_{int}, \mathbf{b}_{int}, \mathbf{c}_{int}, \mathbf{d}_{int}) = \text{Tucker3}(\mathbf{E}_p) \quad (\text{ec. II.43.})$$

Las concentraciones de los analitos podrían ser calculadas por una expresión similar a la ecuación II.40, excepto que  $\mathbf{S}_{cal}$  se reemplaza por  $\mathbf{S}_{exp}$ , una versión expandida de  $\mathbf{S}_{cal}$ :

$$\mathbf{y}_u = \mathbf{S}_{exp} + \text{vec}(\mathbf{X}_u) \quad (\text{ec. II.44.})$$

El número de interferencias  $N_{int}$  puede evaluarse comparando los residuos finales  $s_u$  con el nivel de ruido instrumental, donde:

$$s_u = \|\text{vec}(\mathbf{E}_u)\| / [JKL - (N_{cal} + N_{int})]^{1/2} \quad (\text{ec. II.45.})$$

donde  $\mathbf{E}_u$  proviene de la ecuación:

$$\mathbf{E}_u = \left| \mathbf{X}_u - \sum_{n'=1}^{N_{cal}} \mathbf{S}_{n'} y_{n',u} \right| \quad (\text{ec. II.46.})$$

Una gráfica que represente  $s_u$  frente al número de componentes, mostraría un decrecimiento del valor de éste, comenzando con un valor  $s_p$  cuando  $N_{\text{int}} = 0$ , hasta estabilizarse con un valor comparable con el del ruido instrumental, permitiendo así localizar el número correcto de componentes. Cada vez que se añade un nuevo componente al modelo, el análisis Tucker3 mostrado en la ecuación II.43 se lleva a cabo usando los  $N_{\text{int}}$  componentes.

### II.2.3.3. N-PLS

Como ya dijimos, el algoritmo basado en mínimos cuadrados parciales (PLS) para señales de primer orden, también puede ser extendido a señales de mayor orden [27, 62]. Así, un conjunto de datos dependientes y un conjunto de datos independientes se descomponen simultáneamente para generar un modelo de calibración. No obstante, a diferencia de PARAFAC y TLLS, N-PLS no posee la denominada ventaja de segundo orden.

El modelo de cuatro vías N-PLS se puede expresar:

$$x_{ijkl} = \sum_{f=1}^F t_{if} w_{if}^J w_{kf}^K w_{lf}^L + e_{ijkl} \quad (\text{ec. II.47.})$$

donde  $x_{ijkl}$  es la intensidad de fluorescencia medida para la muestra  $i$ , a la longitud de onda de emisión  $j$ , de excitación  $k$  y al tiempo  $l$ .  $F$  es el número de componentes y  $e_{ijkl}$  son los residuos del modelo (que no son iguales a los residuos de PARAFAC).

El algoritmo N-PLS para datos de tercer orden calcula los scores  $\mathbf{t}$ , que presentan máxima covarianza con  $\mathbf{y}$  (variables dependientes) en un sentido cuatrilíneo. Así, se obtienen cuatro matrices: una matriz  $\mathbf{T}$  que contiene los scores y tres matrices de loadings ponderados  $\mathbf{W}$ , cada una con tantas columnas como componentes haya.

Determinar el número de componentes del modelo es una parte esencial del cálculo. Para ello, se realizará la validación cruzada y se analizará el valor de PRESS, aplicando el criterio de Haaland y Thomas [4, 25].

#### *II.2.3.4. U-PLS y N-PLS acoplados a RTL*

Para datos de tercer orden, U-PLS combinado con trilinealización residual (RTL), constituye una extensión de U-PLS/RBL, para una dimensión adicional. Este procedimiento fue desarrollado en nuestro laboratorio, y aplicado a la determinación de metotrexato y leucovorín [86].

En esta memoria se presenta, por primera vez, el método N-PLS combinado con RTL, que también se ha desarrollado como una extensión de N-PLS combinado con RBL, para una dimensión adicional.

Así, las características de estos algoritmos son análogas a las descritas anteriormente para U-PLS y N-PLS acoplados con RBL, por lo que tan sólo realizaremos una descripción general en cuanto a las diferencias que implica el conjunto de datos con una dimensión añadida y haremos una descripción más detallada del método N-PLS/RTL, propuesto en esta memoria.

En el método N-PLS, aplicado a datos de tercer orden, la información referente a la concentración de los analitos se introduce en la etapa de calibración sin incluir los datos de la muestra desconocida. Las matrices de datos de las  $I$  muestras de calibración, junto con el vector de concentraciones  $\mathbf{y}$  (de tamaño  $I \times 1$ ) se emplean para obtener las matrices de loadings  $\mathbf{W}^j$ ,  $\mathbf{W}^k$  y  $\mathbf{W}^l$  (de tamaños  $J \times A$ ,  $K \times A$  y  $L \times A$ , siendo  $A$  el número de factores), así como los coeficientes de regresión  $\mathbf{b}$  (de tamaño  $A \times 1$ ) [72]. El número de factores  $A$  puede seleccionarse utilizando la técnica de validación cruzada [4].

En ausencia de interferencias,  $\mathbf{b}$  puede emplearse para estimar la concentración del analito calibrado en la muestra desconocida, de acuerdo a:

$$y_u = \mathbf{t}_u^T \mathbf{b} \quad (\text{ec. II.48.})$$

donde  $\mathbf{t}_u$  (de tamaño  $A \times 1$ ) es el vector score de la muestra desconocida, obtenido mediante la adecuada proyección del conjunto de datos sobre las matrices loadings de calibración.

Cuando aparecen componentes no calibrados en la muestra desconocida, los scores obtenidos no son adecuados para predecir la concentración del analito mediante la ecuación anterior. En este caso, los residuos que se obtienen en la etapa de predicción mediante N-PLS ( $s_p$ , ecuación II.49.) serán anormalmente grandes comparados con el nivel de ruido instrumental:

$$s_p = \|\mathbf{e}_p\| / (JKL-A)^{1/2} = \|\text{vec}(\mathbf{X}_u) - \text{vec}(\hat{X}_u)\| / (JKL-A)^{1/2} \quad (\text{ec. II.49.})$$

donde  $\hat{X}_u$  es la matriz de datos de la muestra desconocida ( $\mathbf{X}_u$ ) reconstruida mediante el modelo N-PSL. Por lo tanto, cuando esto ocurre y se requiere la ventaja de segundo orden debido a la presencia de interferencias en la muestra desconocida, puede aplicarse el procedimiento denominado trilinealización residual, RTL, basado en el modelo Tucker3 [85]. Este procedimiento, minimiza los residuos y estima los perfiles de los interferentes.

$$\mathbf{X}_u = \text{reshape}\{\mathbf{t}_u[(\mathbf{W}^j | \otimes | \mathbf{W}^k) | \otimes | \mathbf{W}^l]\} + \text{Tucker3}(\hat{\mathbf{X}}_u - \mathbf{X}_u) + \mathbf{E}_u \quad (\text{ec. II.50.})$$

donde 'reshape' indica la transformación del vector  $JKL \times 1$  en una matriz  $J \times K \times L$ , y  $| \otimes |$  es el operador de Kathri-Rao [72]. Durante el procedimiento RTL, los loadings de ponderación (weight loadings)  $\mathbf{W}^j$ ,  $\mathbf{W}^k$  y  $\mathbf{W}^l$  se mantienen constantes e iguales a los valores obtenidos en la calibración y  $\mathbf{t}_u$  se varía hasta que la norma  $\|\mathbf{E}_u\|$  se minimiza

(ecuación II.50) empleando el procedimiento de Gauss-Newton. Una vez que  $\|\mathbf{E}_u\|$  se ha minimizado, el nuevo vector  $\mathbf{t}_u$  permite predecir la concentración del analito mediante la ecuación II.48.

El modelo Tucker3 se construye normalmente con  $N_{\text{int}}$  componentes en cada dimensión [92], donde  $N_{\text{int}}$  indica el número de interferentes en las muestras y se puede calcular realizando una gráfica que represente  $s_u$  frente al número de interferentes, que mostraría un decrecimiento del valor de  $s_u$ , hasta estabilizarse con un valor comparable con el del ruido instrumental, permitiendo así localizar el número correcto de interferentes. Para un único interferente, el análisis Tucker3 en la ecuación II.50 nos proporciona los perfiles en las tres dimensiones, pero si existieran interferentes adicionales, los perfiles calculados por el modelo no serían los correspondientes a los perfiles espectrales o temporales verdaderos, sino combinaciones lineales de estos últimos.

N-PLS y U-PLS se pueden extender fácilmente a datos de orden superior, dando lugar a N-PLS y U-PLS acoplados a multi-linearización residual, RML, que seguramente se aplicarán en un futuro cercano, debido a la obtención de datos de mayor complejidad cada vez, con la utilización de la moderna instrumentación de que se dispone hoy en día.

### II.3. BIBLIOGRAFÍA

---

1. Escandar G. M., Faber N. M., Goicochea H. C., Muñoz de la Peña A., Olivieri A.C., Poppi R.J., *Trends in Anal. Chem.*, En Prensa (2007).
2. Booksh, K.S.; Kowalski, B.R., *Anal. Chem.*, 66 (1994) 782A.
3. Tauler R., Casassas E., *Anal. Chim. Acta*, 223 (1989) 257.
4. Haaland D.M., Thomas E.V., *Anal. Chem.*, 60 (1998) 1193.
5. Wold S., *Technometrics*, 20 (1978) 397.
6. Martens H., Naes T.; *Multivariate calibration*; John Wiley and Sons. Chichester, (1989).
7. Beebe K.R., Kowalski B.R., *Anal. Chem.*, 59 (1989) 1007A.
8. Thomas E.V., Haaland D.M., *Anal. Chem.*, 62 (1990) 1091.
9. Faber N.M., Bro R., Hopke P.K., *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 65 (2003) 119.
10. Stark E., Luchter K., Margoshes M., *Applied Spectroscopy Rev.*, 22 (1986) 335.
11. Manne, R., *Chemom. Intel. Lab. Syst.*, 2 (1987) 187.
12. Lorber, A., Wangen, L., Kowalski, B.R., *J. of Chemom.*, 1 (1987) 19.
13. Martens, H., Karstang, T., Naes, T., *J. of Chemom.* 1 (1987) 201.
14. Wold, S., Kettaneh-Wold, N., Skagerberg; B., *Chemom. Intel. Lab. System*, 7 (1989) 53.
15. Kowalski, B.R., Seasholtz, M.B.; *J. Chemom*, 5 (1991) 129.
16. Geladi, P., Kowalski, B.R.; *Anal. Chim. Acta*, 185 (1986) 1.
17. Frank, I.; *Chemom. Intel. Lab. Syst.*, 8 (1990) 108.
18. Wold, S.; *Chemom. Intel. Lab. Syst.*, 14 (1992) 57.
19. Tauler, R., Izquierdo- Ridorsa, A., Casassas, E.; *Anales de Química*, 87 (1991) 571.
20. Walpole, R.E., Myers, R.H.; *Probabilidad y Estadística para Ingenieros*, 3ª ed. Interamericana. México (1990).
21. Barker, G.C., Gardner, A.W.; *At. Energy Res. Establ. (GB). AERE Harwell C/R* (1958) 2297.
22. Barker, G.C., Gardner, A.W, *Anal. Chem.*, 173 (1960) 79.
23. Parry, E.P., Osteryoung, R.A.; *Anal. Chem.*, 36 (1964) 1366.
24. Naes, T., Isaksson, T., Kowalski, B. R., *Anal. Chem.*, 62 (1990) 664.



25. Haaland D.M., Thomas EV, *Anal. Chem.*, 60 (1988) 1202.
26. Sekulic S., Seasholtz M.B., Wang Z., Kowalsky B.R., Lee S.E., Holt B.R., *Anal. Chem.*, 65 (1993) 835A.
27. Bro R., *Chem. Intell. Lab. Syst.*, 38 (1997) 149.
28. Bro R., Workman J.J. Jr., Mobley P.R., Kowalski B.R., *Appl. Spectrosc. Rev.*, 32 (1997) 237.
29. Bro R., *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 36 (2006) 293.
30. Beltran J.R., Guiteras J., Ferrer R., *Anal. Chem.*, 70 (1998) 1949.
31. Jiji R.D., Booksh K.S., *Anal. Chem.*, 72 (2000) 718.
32. Cao Y.Z., Chen Z.P., Mo C.Y., Wu H.L., Yu R., *Analyst*, 125 (2000) 2303.
33. Saurina J., Tauler R., *Analyst*, 125 (2000) 2038.
34. Saurina J., Leal C, Compañó R., Granados M., Tauler R., Prat M.D., *Anal. Chim. Acta*, 409 (2000) 237.
35. Moberg L., Robertson G., Karlberg B., *Talanta*, 54 (2001) 161.
36. Esteves da Silva J.C.G., Litao J.M.M., Costa F.S., Ribeiro J.L.A., *Anal. Chim. Acta*, 453 (2002) 105.
37. Cao Y.Z., Mo C.Y., Long J.G., Chen H., Wu H.L., Yu R.Q., *Anal. Sci.*, (2002) 333.
38. Arancibia, J. A., Olivieri, A. C., Escandar, G. M., *Anal. Bioanal. Chem.* 374 (2002) 451.
39. Muñoz de la Peña A., Espinosa Mansilla A., González Gómez D., Olivieri A. C., Goicoechea H. C., *Anal. Chem.*, 75 (2003) 2640.
40. Espinosa Mansilla A., Muñoz de la Peña A., González Gómez D., Salinas F., *Anal. Chim. Acta*, 531 (2005) 257.
41. Trevisan M.G., Poppi R., *Anal. Chim. Acta*, 493 (2003) 69.
42. Arancibia, J. A., Escandar, G. M., *Talanta*, 60 (2003) 1113.
43. Rodríguez Cuesta M.J., Boque R., Rius F.X., Picon Zamora D., Martínez Galera M., Garrido Frenich A., *Anal. Chim. Acta*, 491 (2003) 47.
44. Escandar, G. M., González Gómez D., Espinosa Mansilla A., Muñoz de la Peña A., Goicoechea H. C., *Anal. Chim. Acta*, 506 (2004) 161.
45. Damiani P.C., Nepoti A.J., Olivieri A.C., *Anal. Chem.*, 76 (2004) 2798.

46. Esteves da Silva J.C.G., Novais S.A.G., *Analyst*, 123 (1998) 2067.
47. Esteves da Silva J.C.G., Tavares M.J.C.G., Tauler R., *Chemosphere*, 64 (2006) 1939.
48. Antunes M.C.G., Esteves da Silva J.C.G., *Anal. Chim. Acta*, 546 (2005) 52.
49. Esteves da Silva J.C.G., Tauler R., *Appl. Spectrosc.*, 60 (2006) 1315.
50. Leitao J.M.M., Esteves da Silva J.C.G., *Anal. Chim. Acta*, 559 (2006) 271.
51. Piccirilli G., Escandar G.M., *Analyst*, 131 (2006) 1012.
52. Haimovich A., Orselli R., Escandar G.M., Olivieri A.C., *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 80 (2006) 99.
53. Muñoz de la Peña A., Espinosa Mansilla A., Mora Díez N., Bohoyo Gil D., Olivieri A.C., Escandar G.M., *Appl. Spectrosc.*, 60 (2006) 330.
54. Mora Díez N., Bohoyo Gil D., Olivieri A.C., Escandar G.M., Muñoz de la Peña A., *Anal. Chim. Acta*, 569 (2006) 25.
55. Mahedero M.C., Mora Díez N., Muñoz de la Peña A., Espinosa Mansilla A., González Gómez D., Bohoyo Gil D., *Talanta*, 65 (2004) 806.
56. Giménez D., Sarabia A., Ortiz M.C., *Anal. Chim. Acta*, 544 (2005) 327.
57. Giménez D., Sarabia A., Ortiz M.C., *Analyst*, 130 (2005) 1639.
58. Espinosa Mansilla A., Muñoz de la Peña A., Cañada Cañada F., González Gómez D., *Anal. Biochem.*, 347 (2005) 275.
59. Sánchez E., Kowalski B.R., *Anal. Chem.*, 58 (1986) 496.
60. Sánchez E., Kowalski B.R., *J. Chemom.*, 2 (1988) 265.
61. Chen Z. P., Wu H. L., Jiang J.H., Li Y., Yu R.Q., *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 52 (2000) 75.
62. Bro R., *J. Chemom.*, 10 (1996) 47.
63. Tauler R., *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 30 (1995) 133.
64. Linder M., Sundberg R., *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 42 (1988) 159.
65. Linder M., Sundberg R., *J. Chemom.*, 16 (2002) 12.
66. Wold S., Geladi P., Esbensen K., Øhman J., *J. Chemom.*, 1 (1987) 41.
67. Øhman J., Geladi P., Wold S., *J. Chemom.*, 4 (1990) 79.
68. Olivieri A. C., *J. Chemom.*, 19 (2005) 253.

69. Bohoyo Gil, D.; Muñoz de la Peña, A.; Arancibia, J. A.; Escandar, G. M.; Olivieri, A. C., *Anal. Chem.* 78 (2006) 8051.
70. Culzoni, M. J.; Goicoechea, H. C.; Pagani, A. P.; Cabezón, M. A.; Olivieri, A. C. *Analyst*, 131 (2006) 718.
71. García Reiriz, A.; Damiani, P. C.; Olivieri, A. C. *Talanta*, 71 (2007) 806-815.
72. Bro, R., *Multi-way analysis in the food industry*, Doctoral Thesis, University of Amsterdam, Netherlands (1998).
73. Harsman R.A., UCLA workings papers in phonetics, 16 (1979).
74. Carroll J., Chang J., *Pshicometrika*, 35 (1970).
75. Bro R., Kiers H.A.L.; *J. Chemom.*, 17 (2004) 274.
76. Bro R., *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 5 (1992) 143.
77. Bro R., Andersson C.A., *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 42 (1998) 10.
78. Andersson C.A., Bro R., *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 42 (1998) 93.
79. Wu H.L., Shibukawa M., Oguma K., *J. Chemom.*, 12 (1998) 1.
80. Sena M. M., Fernandes J. C. B., Rover L. Jr., Poppi R. J., *Anal. Chim. Acta*, 409 (2000) 159.
81. Tan Y.X., Jiang J.H., Wu H.L., Cui H., Yu R.Q., *Anal. Chim. Acta* 412 (2000) 195.
82. Nikolajsen R.P.H., Booksh K.S., Hansen A.M., Bro R., *Anal Chim Acta*, 475 (2003) 137.
83. Muroski A. R., Booksh K. S., Myrick M. L., *Anal. Chem.*, 68 (1996) 3534.
84. Nahorniak M. L., Cooper G. A., Kim Y. C., Booksh K. S., *Analyst*, 130 (2005) 85.
85. Olivieri AC, Arancibia JA, Muñoz de la Peña A, Durán-Merás I, Espinosa Mansilla A, *Anal Chem*, 76 (2004) 5657.
86. Arancibia J.A., Olivieri A.C., Bohoyo Gil D., Espinosa Mansilla A., Durán Merás I., Muñoz de la Peña A., *Chemom. Intel. Lab. Syst.*, 80 (2006) 77.
87. Muñoz de la Peña A., Durán Merás I., Jiménez Girón A., *Anal. Bioanal. Chem.*, 385 (2006) 1289.
88. Muñoz de la Peña A., Durán Merás I., Jiménez Girón A., Goicoechea H.C., *Talanta* (2007) doi: 10.1016/j.talanta.2007.01.018.

89. Kim Y. C., Jordan J. A., Nahorniak M. L., Booksh K. S., *Anal. Chem.*, 77 (2005) 7679.
90. Goicoechea H.C., Yu S., Olivieri A.C., Campliglia A.D., *Anal. Chem.*, 77 (2005) 2608.
91. Leurgans S., R.T. Ross, *Statist. Sci.*, 7 (1992) 289.
92. Nahorniak, M. L.; Cooper, G. A.; Kim, Y. C.; Booksh, K. S. *Analyst*, 130 (2005) 85.

### **Capítulo III**

**DETERMINACIÓN DE FLUOROQUINOLONAS EN FÁRMACOS  
MEDIANTE QUIMIOLUMINISCENCIA RESUELTA EN EL  
TIEMPO. RESOLUCIÓN DE MEZCLAS BINARIAS MEDIANTE  
MÍNIMOS CUADRADOS PARCIALES (PLS)**



### III.1. INTRODUCCIÓN

#### III.1.1. Características de las fluoroquinolonas

Las fluoroquinolonas son un importante grupo de agentes antibacterianos desarrollados en la década de los 80 [1].

A principios de los años 60, Lescher y colaboradores, en plena síntesis de la cloroquina, descubren, de forma fortuita, la primera 4-quinolona, denominándola ácido nalidíxico [2].

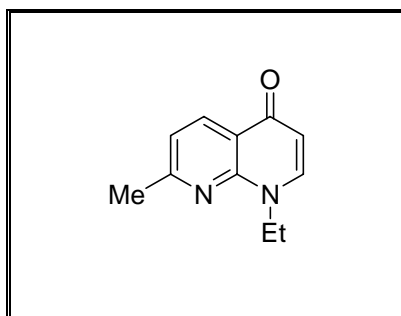


Figura III.1. Ácido Nalidíxico.

Su baja difusión tisular y su alta unión a las proteínas, impide su utilización en infecciones sistémicas, por tal motivo, su uso ha sido limitado.

Esta familia de quimioterápicos evolucionó lentamente, apareciendo en la década del 70 otros miembros; ácido oxolónico, cinoxacino, ácido piromídico y ácido pipemídico, todos con adelantos escasos respecto al primero.

Años después, en 1984, debido a la introducción de un átomo de flúor en el núcleo básico, aparecen las primeras 4-fluoroquinolonas, también llamadas quinolonas de segunda generación, encabezadas por el norfloxacino y seguidas por el pefloxacino,

ofloxacino, ciprofloxacino, fleroxacino y temafloxacino (esta última fuera del mercado por reacciones adversas graves), todas con una importante actividad contra bacterias Gram negativas y escasa contra Gram positivas (exceptuando estafilococos), buena biodisponibilidad por vía oral y excelente tolerancia [3].

En la década del 90 fueron sintetizados varios componentes de esta familia, con mejoras importantes en su biodisponibilidad, vida media y espectro, específicamente sobre el *Streptococcus pneumoniae*, las que han sido clasificadas como quinolonas de tercera generación (*tosufloxacino*, *levofloxacino* y *sparfloxacino*) [4].

En los últimos años han sido aprobadas cinco nuevas quinolonas (*moxifloxacino*, *gatifloxacino*, *clinafloxacino*, *trovafloxacino*, *sitafoxacino*) también conocidas como quinolonas de cuarta generación, las cuales incluyen en su espectro los gérmenes anaerobios [5, 6].

El importante desarrollo de esta familia la ha situado en la avanzada del tratamiento antimicrobiano de las enfermedades infecciosas, siendo consideradas en la actualidad dentro del grupo de antimicrobianos de élite para enfrentar las sepsis por gérmenes con alta virulencia y resistencia.

➤ *Clasificación química*

En 1997 se crea una nueva clasificación, que más adelante se fue ampliando con la aparición de nuevos compuestos. Las quinolonas se agruparon por generaciones, coincidiendo con su época de aparición y, sobre todo, con el espectro bacteriano [4, 5].



Tabla III.1. Clasificación química de las quinolonas.

1ª GENERACIÓN	2ª GENERACIÓN	3ª GENERACIÓN*	4ª GENERACIÓN
Acido nalidíxico	Norfloxacinó	Difloxacinó	Trovafloxacinó*
Acido oxolínico	Enoxacinó*	Amifloxacinó	Gatifloxacinó*
Acido piromídico*	Pefloxacinó*	Temafloxacinó	Moxifloxacinó
Acido pipemídico	Ciprofloxacino	Lomefloxacino	Balofloxacinó*
Cinoxacinó*	Ofloxacinó	Esparfloxacinó	Gemifloxacinó*
Rosoxacinó*	Fleroxacinó*	Levofloxacinó	Pazufloxacinó*
	Lomefloxacino*	Tosufloxacinó	
		Clinafloxacino	
		Sarafloxacinó	

\* No comercializadas en España

**1ª generación** (antiguas quinolonas). Se utilizan exclusivamente como antisépticos urinarios porque no alcanzan niveles séricos suficientes y se eliminan por orina en forma activa. Todas ellas se administran solamente por vía oral.

**2ª generación.** Son las fluoroquinolonas monofluoradas. Comparadas con las anteriores tienen una actividad más potente, un mayor espectro antibacteriano, una semivida más larga y, con la excepción de norfloxacino y enoxacinó, alcanzan buenos niveles séricos, con lo que es posible tratar infecciones sistémicas. Ciprofloxacino, ofloxacinó y pefloxacino se pueden administrar tanto por vía oral como parenteral.

**3ª generación.** Son las fluoroquinolonas bi o trifluoradas (no comercializadas en España). Comparadas con las anteriores, unas presentan una semivida mayor y, otras, un mayor espectro antibacteriano, que en algunos casos incluye bacterias gram (+) (estreptococo sobre todo), intracelulares (*Chlamydia*, *Mycoplasma*, micobacterias, etc) y anaerobias.

**4ª generación.** Las de cuarta generación aportan una mejora en la actividad frente a grampositivos y, además, una buena actividad frente a anaerobios.

➤ *Estructura química*

Las quinolonas poseen una estructura común: la 4-oxo-1,4-dihidroquinoleína, de la cual derivan las quinolonas fluoradas y no fluoradas. Su núcleo central es el 7-piperazino-4-quinolona, al que incorporándole uno, dos o tres átomos de flúor en su molécula, da lugar a las llamadas 4-fluoroquinolonas [2, 7].

Estos principios activos forman un grupo de agentes antimicrobianos, con estructuras y comportamientos químicos diferentes. La estructura general de estas quinolonas consiste en 1-sustituyente-1,4-dihidro-4-oxopiridina-3-carboxílico con un anillo aromático, Figura III.2.

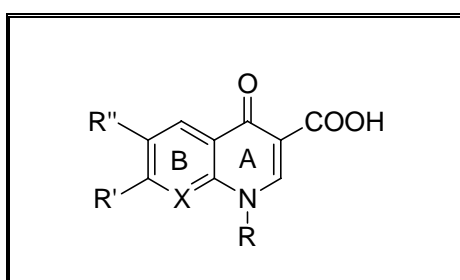


Figura III.2. Estructura general de las quinolonas. X= C ó N; R= ciclopropil, etil, fluoroetil, metilamino, fluorofenilo o anillo tiazínico u oxacínico. R' = piperacino-4-ilo, 3-metilpiperacino-1-ilo; R'' = átomo de fluor.

➤ *Mecanismo de acción*

Consiste fundamentalmente en la inhibición de la síntesis de ADN bacteriano, provocada por el bloqueo de la subunidad A de la ADN girasa (topoisomerasa II), enzima perteneciente al grupo de las topoisomerasas, las cuales, en número de cuatro, son esenciales para la duplicación del ADN.

Las bacterias confrontan un gran problema topológico ya que en su gran mayoría miden 2  $\mu\text{m}$  de longitud por 1  $\mu\text{m}$  de ancho, teniendo que contener en su interior un ADN de doble cadena de 1300  $\mu\text{m}$  de longitud. Esto lo logran gracias a la acción de la

enzima topoisomerasa II, la cual es responsable del enrollamiento de dichas bandas, manteniendo los cromosomas en un estado de superespiral, fijándolo a la superficie interna de la célula. Además, dicha enzima se encarga de la reparación de pequeñas roturas de filamento de ADN, que ocurren durante el proceso de multiplicación del mismo.

Recientemente, se ha determinado que, además de la topoisomerasa II, existe participación de la topoisomerasa IV, encargada de separar la parte replicada del ADN.

El bloqueo de esta última tiene su mayor importancia en las bacterias Gram positivas siendo secundario en las Gram negativas.

El bloqueo de dichas enzimas ofrece una explicación para la inhibición de la multiplicación bacteriana, pero no lo suficiente para explicar el efecto bactericida. Crumplin y Smith propusieron, en 1975, que el efecto bactericida aparece al ser inhibidas las topoisomerasas y quedar sin reparación porciones dañadas del ADN, lo cual desencadenaría un proceso de endonucleosis (producción de endonucleasas).

Es interesante que, a pesar de existir este mismo tipo de topoisomerasas en las células humanas (eucariotas), éstas no se ven afectadas por la acción de estos compuestos, debido a que las mismas están formadas por solo 2 subunidades en lugar de 4, como poseen las células bacterianas [2, 3, 7].

➤ *Campo de aplicación*

Las quinolonas de primera generación están aprobadas para infecciones urinarias (cistitis, pielonefritis) e intestinales (disenteria bacilar, salmonelosis, enterocolitis por *E. coli*).

Las quinolonas de segunda generación pueden ser utilizadas con gran efectividad, en infecciones urinarias. También se utilizan en las infecciones respiratorias por su excelente penetración en las secreciones bronquiales y su acción sobre bacterias Gram negativas, especialmente en las infecciones respiratorias altas (sinusitis, otitis), sobre todo en la otitis externa maligna del diabético, por la participación de *P. aeruginosa*. Efectivas en las infecciones biliares, de piel y tejidos blandos y gastrointestinales (cólera, diarrea del viajero, disenterías, fiebre tifoidea).

Por su excelente difusión prostática, lo que logran pocos antimicrobianos, se han convertido en principios activos de primera línea en las prostatitis.

Su gran absorción intestinal, su importante difusión ósea y su espectro sobre estafilococos y Gram negativos, han convertido a éstas, en principios activos de primera línea en el tratamiento de la osteomielitis, facilitando la aplicación de tratamientos prolongados por vía oral.

Juegan actualmente un importante papel en los pacientes portadores de fibrosis quística, los cuales se contaminan frecuentemente con *Pseudomonas aeruginosa* y *cepacia*, y los portadores de enfermedad pulmonar obstructiva crónica, que se infectan frecuentemente con *H. influenzae* y *M. Catarrhalis*.

Las quinolonas de tercera generación, con su ampliado espectro sobre los cocos Gram positivos y su vida media prolongada, han pasado a ocupar un lugar importante en la sepsis respiratoria de la comunidad.

Con el espectro ampliado a los gérmenes anaerobios, las quinolonas de cuarta generación (trovafloxacino, clinafloxacino, sitafloxacino) han sido utilizadas con éxito en las infecciones mixtas (abdominales, ginecológicas, etc).

### III.1.2. Características de Norfloxacin, Ofloxacin y Ciprofloxacin

En este trabajo, se ha llevado a cabo el estudio de tres quinolonas: *norfloxacin*, *ofloxacin* y *ciprofloxacin*, todas ellas englobadas en las denominadas de segunda generación.

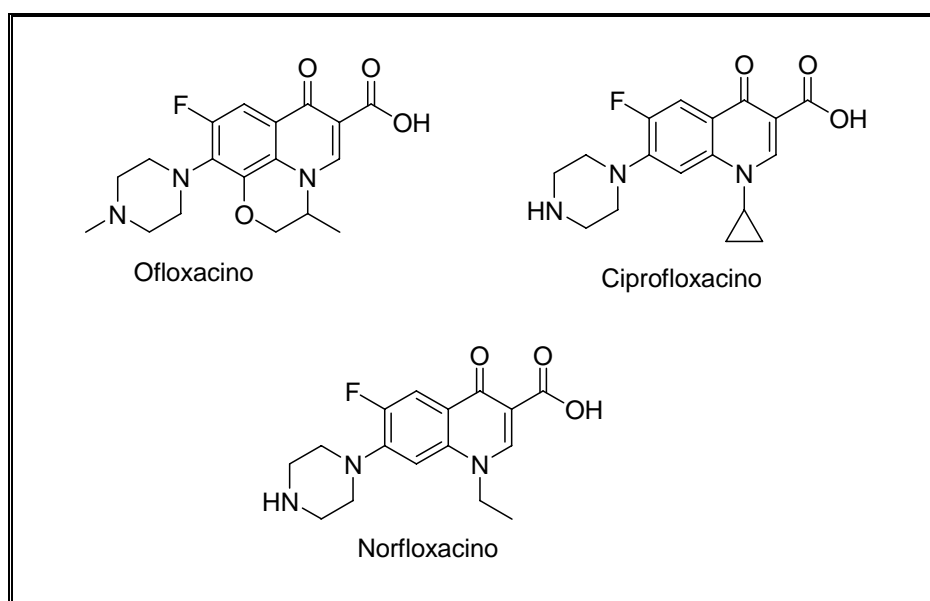


Figura III.3. Estructura química de las quinolonas estudiadas en este capítulo.

El ciprofloxacin (CIP), se emplea en las infecciones de huesos, en la gastroenteritis causada por *Shigella* or *Campylobacter*, infecciones del tracto respiratorio, urinarias y de la piel. Además, se emplea como principio activo alternativo en el tratamiento de la gonorrea y salmonela [8, 9]. En general, CIP es activo contra bacterias aerobias gram-negativas y gram-positivas, por lo tanto, no debe emplearse solo en infecciones causadas por mezcla de bacterias aeróbicas y anaeróbicas [9, 10].

El norfloxacin (NOR), fue la primera quinolona antibacteriana encontrada [11], con un átomo de flúor en la posición C-6 y un grupo piperacino en la sustitución C-7. Este fármaco representó el primer incremento significativo en la actividad antibacteriana, por encima de las primeras quinolonas, con un espectro que cubre tanto a

los organismos Gram-positivos como Gram-negativos, incluyendo a las *Pseudomonas aeruginosa*, y se emplea en infecciones gastrointestinales, urinarias y respiratorias [9].

El ofloxacino (OFL), fue sintetizado por Hayakawa y col. [12]. Es efectivo para el tratamiento de una gran variedad de infecciones crónicas, tales como las que aparecen en el tracto urinario, respiratorio y osteomielitis.

### **III.1.3.Revisión bibliográfica**

Debido a los controles de calidad farmacéuticos, hay mucho interés en la determinación de fluoroquinolonas, por lo que se han desarrollado numerosos procedimientos de análisis. La mayoría de los métodos analíticos que se emplean para la determinación de fluoroquinolonas emplean HPLC. En 1998, Carlucci publicó una revisión de estos métodos con detección UV o fluorescente [13]. Posteriormente, se han publicado otros trabajos que emplean también detección UV [14, 15] y fluorescente [16-21].

En cuanto a la determinación simultánea de estos analitos, sin etapa separativa previa, hay pocos trabajos publicados, ya que prácticamente la totalidad de los procedimientos de análisis descritos, se llevan a cabo mediante una etapa previa o intermedia, de separación cromatográfica. Los trabajos en los que no es utilizada la técnica cromatográfica, se tratan, en su mayor parte, de métodos para análisis de componentes simples mediante técnicas espectrofotométricas [22-25], o espectrofluorimétricas [25, 26] y electroforesis [26-29].

#### **III.1.4. Características generales de la Quimioluminiscencia**

La Quimioluminiscencia (QL) se puede definir como la emisión de radiación electromagnética (ya sea en la zona del ultravioleta, visible o infrarrojo cercano) por moléculas o átomos, como resultado de transiciones entre estados electrónicamente excitados a estados de más baja energía, los cuales suelen ser estados fundamentales. La principal característica de este proceso es que la excitación se produce mediante una reacción química, es decir, en ausencia de fuente externa de excitación y, además, se cumple que la intensidad de emisión es función de la concentración de las especies químicas implicadas en la reacción QL, por lo que las medidas de la intensidad de emisión pueden emplearse con fines analíticos.

El fenómeno de la quimioluminiscencia se conoce desde 300 años a.C. y, gracias a la nueva instrumentación y, especialmente, a la incorporación de técnicas modernas, algunas nuevas y otras tomadas de otras disciplinas, el desarrollo de aplicaciones analíticas es relativamente reciente, aplicándose de forma rutinaria en el análisis tanto cualitativo como cuantitativo. Además, los métodos basados en detecciones quimioluminiscentes representan una alternativa simple, barata y sensible para cuantificar una gran variedad de compuestos, siendo de mayor interés la determinación QL en fase líquida [30].

Los excelentes límites de detección que presenta la QL se deben a la ausencia de una fuente de ruido y dispersión y, su alta selectividad, resulta del limitado número de reacciones quimioluminiscentes disponibles y los amplios rangos lineales que pueden obtenerse.

En general, una reacción quimioluminiscente puede generarse mediante dos mecanismos básicos, mediante una reacción directa o mediante una reacción indirecta (Figura III.4). En ambos intervienen los siguientes reactivos: un sustrato, uno o varios catalizadores y los denominados cofactores.

El sustrato es el precursor quimioluminiscente, que se convierte en la molécula excitada electrónicamente, responsable de la emisión de luz.

El catalizador, enzima o ión metálico, reduce la energía de activación y proporciona el ambiente adecuado para la producción de una alta eficiencia quimioluminiscente durante el proceso.

Los cofactores son necesarios, en ocasiones, para convertir uno o más de los sustratos en una forma capaz de reaccionar e interactuar con el catalizador, o para proporcionar un grupo “saliente” eficaz cuando se requiere un marcado para producir el emisor excitado.

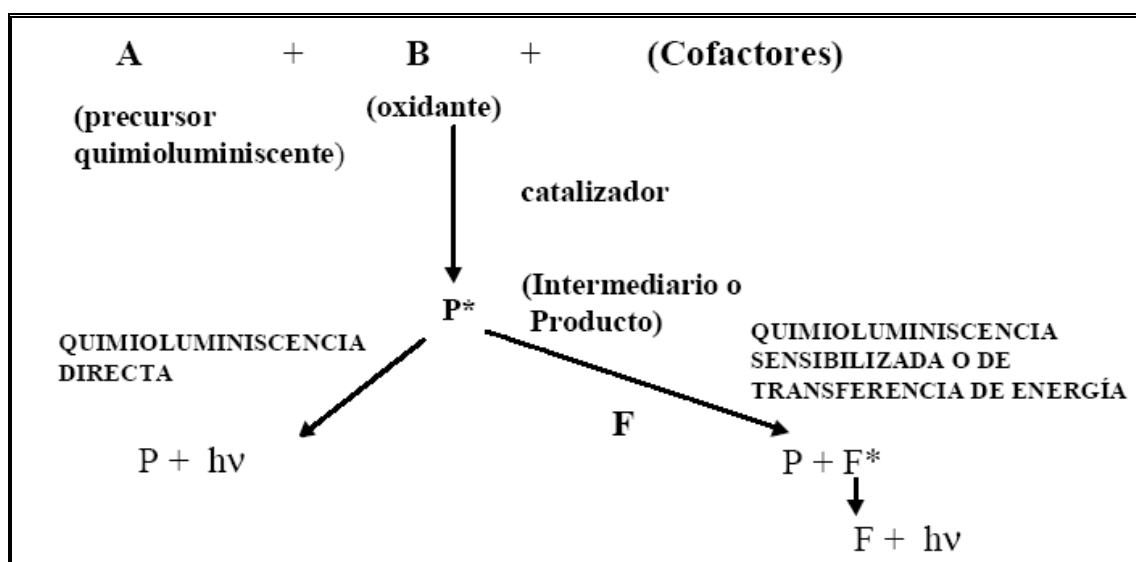


Figura III.4. Tipos de reacciones en QL (*P*: producto, *F*: sustancia fluorescente).

En el primer caso (reacción directa), dos reactivos, normalmente un sustrato y un oxidante en presencia de algunos otros reactivos (cofactores), y algunas veces en presencia de un catalizador, reaccionan para formar un producto o intermedio de la reacción. Después, parte del producto o intermedio pasa a un estado electrónicamente excitado, que puede, a continuación, relajarse hasta el estado fundamental con emisión de un fotón.



La quimioluminiscencia indirecta o sensibilizada se basa en un proceso de transferencia de energía de la especie excitada a un fluoróforo que, a su vez, es excitado, volviendo a su estado fundamental con la emisión de un fotón. Se utiliza principalmente en aquellos casos en los cuales las moléculas no puedan emitir directamente quimioluminiscencia.

Las reacciones quimioluminiscentes pueden tener lugar en fase sólida, líquida y gaseosa. Como nuestro objetivo es llevar a cabo esta técnica en fase líquida, a continuación haremos un repaso a las principales reacciones quimioluminiscentes en este medio.

➤ *Principales reacciones quimioluminiscentes en fase líquida*

Comentaremos en primer lugar las reacciones directas más comunes en base a los substratos o precursores utilizados:

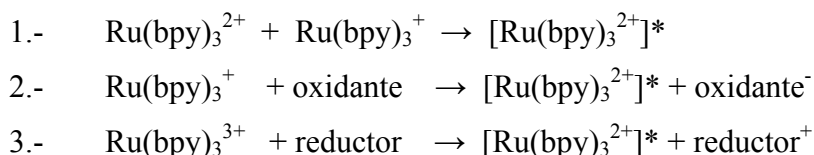
*a) Reacciones que utilizan, como substratos o precursores, derivados de las acilhidracinas:* dentro de este grupo se encuentra el reactivo más estudiado que es el luminol, que en presencia de oxidantes (permanganato, hipoclorito, yodo o peróxido de hidrógeno) y en medio básico, origina un intermedio excitado que al volver al estado fundamental, emite radiación electromagnética a 425 nm. Esta reacción quimioluminiscente es catalizada por iones metálicos, tales como Fe(II), Cu(II), Co(II), por ferricianuro o por algunos metalocomplejos como hemina, hemoglobina o peroxidasa. Lo que permite, en todos los casos, la determinación indirecta de estas especies.

*b) Reacciones que utilizan, como substratos o precursores, derivados de los imidazoles:* en este caso, la lofina es el precursor más utilizado y en medio básico y en presencia de peróxido-hipoclorito o peróxido-hexacianoferrato (III) y O<sub>2</sub> es oxidada a hidroperóxido, a partir del cual se forman diaroilamidas en estado excitado a través de una

estructura de dioxetano, que es la responsable de emisión de radiación a 525 nm. Esta reacción ha permitido la determinación de Co (II), Cr (III), Cu (II),  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ ,  $\text{MnO}_4^-$ ,  $\text{ClO}^-$ , entre otros.

c) *Reacciones que utilizan, como substratos o precursores, ésteres de acridinio:* la oxidación de estos precursores tiene lugar en medio básico y en presencia de peróxido de hidrógeno. Es necesario trabajar en presencia de pequeñas cantidades de dodecilsulfato sódico, porque el intermedio excitado que se forma es insoluble en agua. Esta reacción ha permitido la determinación de varios iones, compuestos oxidantes o reductores como el ácido ascórbico.

d) *Reacciones que utilizan, como substratos o precursores, el complejo tris(2,2'-bipiridina) rutenio (III),  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ :* en este caso el intermedio excitado  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}]^*$ , produce emisión de radiación naranja a 610 nm. El estado excitado intermedio puede conseguirse por diversas reacciones que implican la transferencia de un electrón y regeneración de la especie  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ :



En cualquiera de estas reacciones, la intensidad quimioluminiscente es linealmente proporcional a la concentración de cualquiera de los reactivos, lo que permite la determinación ajustando adecuadamente la concentración de los restantes reactivos que intervienen en ella. Este reactivo se ha empleado frecuentemente en QL en fase líquida para determinar analitos que contienen aminas alifáticas en su estructura.

Dentro de la quimioluminiscencia indirecta, uno de los sistemas no biológicos más frecuentemente utilizados se basa en la reacción quimioluminiscente de los peroxioxalatos (PO-QL), que supone la oxidación por peróxido de hidrógeno de un éster aril oxalato en presencia de un fluoróforo. La reacción parece que sigue un mecanismo

denominado “luminiscencia de intercambio electrónico iniciada químicamente” (CIEEL, chemically initiated electron exchange luminescence mechanism), a través de un intermediario de alta energía, la 1,2-dioxietanodiona, que forma un complejo de carga con el fluoróforo, donando un electrón al intermediario [31]. Este electrón es transferido al fluoróforo, que alcanza un estado excitado y, al regresar al estado fundamental, produce una emisión característica propia de la naturaleza del fluoróforo. El bis-(2,4,6-triclorofenil) oxalato y el bis-(2,4-dinitrofenil) oxalato son los precursores más usados. La principal desventaja de este sistema reside en la insolubilidad de estos compuestos en agua y su inestabilidad por hidrólisis, por lo que se requiere el uso de disolventes orgánicos, tales como, acetonitrilo, dioxano, terbutanol y acetato de etilo. Esta reacción se aplica a la determinación de un gran número de compuestos como peróxido de hidrógeno, sustancias altamente fluorescente (ej. hidrocarburos aromáticos policíclicos) o compuestos que, no siendo fluorescentes, pueden convertirse en fluorescentes, por reacción química con cloruro de dansilo (aminoácidos, esteroides, aminas alifáticas, ácidos carboxílicos, etc.) o con fluoescamina (catecolaminas) [32].

Existe una tercera posibilidad, desarrollada en los últimos años, que consiste en la reacción del analito en cuestión con oxidantes fuertes, tales como  $\text{MnO}_4^-$ ,  $\text{ClO}^-$ ,  $\text{Ce}(\text{IV})$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  o  $\text{Br}_2$ , entre otros, así como con reductores, en diferentes condiciones químicas.

#### ➤ *Instrumentación*

En esta técnica, una vez mezclados los reactivos y la muestra, comienza la reacción quimioluminiscente y, la intensidad de la emisión que se está produciendo, disminuye una vez que los reactantes se han agotado. Se puede llevar a cabo en modo estático o mediante sistemas en flujo continuo.

En modo estático, los reactivos se mezclan rápidamente en la cubeta de reacción y se registra la curva completa de intensidad de emisión de quimioluminiscencia, en función del tiempo de reacción.

En los sistemas en flujo continuo, la muestra y los reactivos son bombeados y mezclados en una cámara de mezcla, que debe estar muy próxima a la célula donde tiene lugar la detección. El óptimo de sensibilidad se consigue ajustando la velocidad de flujo y el volumen entre el punto de mezcla y el punto de detección. La señal que se obtiene es un pico en el que, tanto la intensidad máxima, como el área del pico, son proporcionales a la cantidad de analito inyectado.

La célula de reacción más utilizada tiene forma de espiral, de aproximadamente 1 cm y de pequeño grosor, entre 50 - 100  $\mu\text{m}$ .

El detector empleado debe reunir los siguientes requisitos:

- Ser capaz de detectar una señal luminosa de varios órdenes de magnitud de intensidad.
- Ser sensible en la región completa del visible, 380 - 750 nm
- La señal debe estar directamente relacionada con la intensidad de luz que le llega.
- La velocidad de respuesta debe ser más rápida que la velocidad de la propia reacción.

De acuerdo con estos requisitos, los detectores más utilizados son tubos fotomultiplicadores y, según su posición con respecto a la célula de reacción, podemos distinguir entre detectores ocupando una posición lateral (side-on) con respecto a la célula o situados en posición frontal (end-on) con respecto a la célula. Estos últimos tienen un fotocátodo de mayor área y ofrecen una uniformidad superior en la detección y, por tanto, en la respuesta del sistema.

Un esquema de un montaje de un sistema de quimioluminiscencia en flujo continuo se presenta en la Figura III.5.

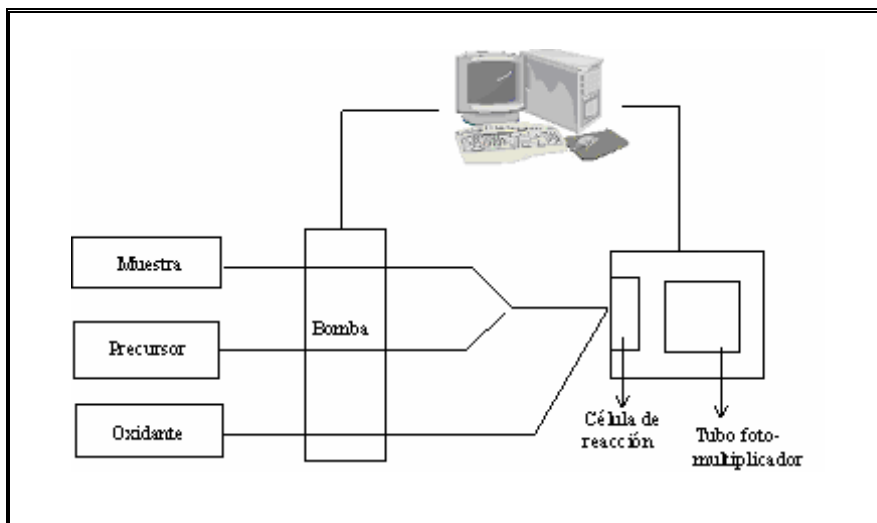


Figura III.5. Montaje de un sistema QL en flujo continuo.

Como hemos indicado, las celdas más utilizadas son en espiral y un esquema de una de este tipo se muestra en la Figura III.6.

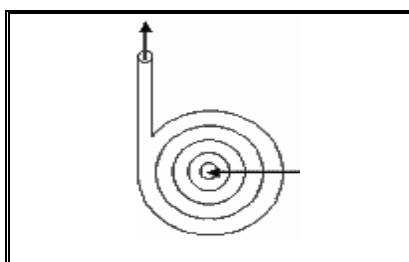


Figura III.6. Esquema de una celda de detección en espiral.

El perfil típico de la señal transitoria de la quimioluminiscencia (representación de la intensidad frente al tiempo) es una curva, representada en la Figura III.7. Esta corresponde a una cinética de primer orden de una secuencia de dos etapas consecutivas, denominadas de forma muy general:

1. Generación de la especie luminiscente, por medio de la mezcla del reactivo sustrato y oxidante.
2. Formación del producto final.

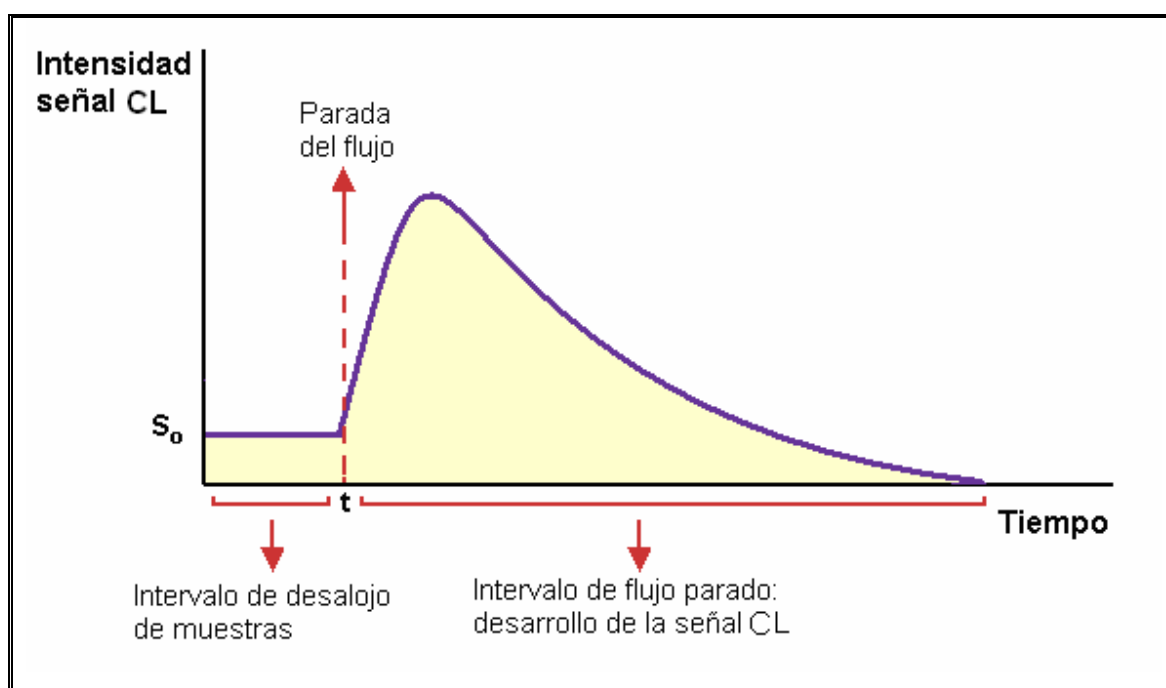
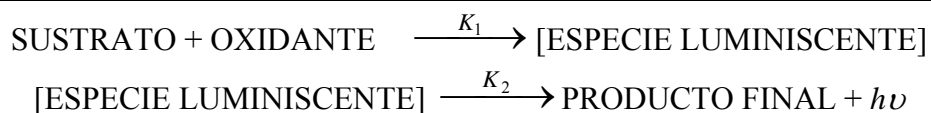


Figura III.7. Representación del perfil obtenido mediante la técnica utilizada.

Una vez que una muestra ha sido medida, automáticamente se pone en marcha la bomba durante un cierto tiempo  $t$ , que permita desalojar la muestra anterior de la celda y del sistema de transporte. Como se observa en la Figura III.7, se mantiene el sistema de flujo para asegurarnos que la muestra que queremos determinar llega de forma reproducible a la celda. Como ha de llenarse la celda y la mezcla de reactivos tiene lugar un poco antes de la celda, aparece una señal inicial  $S_0$  que es constante. La señal se obtiene cuando el flujo es detenido de forma instantánea mediante la parada de la bomba. En este momento, la variación de la señal es leída durante el tiempo estimado

para poder registrar el desarrollo total de la señal. Pasado este tiempo, se vuelve a repetir el proceso.

Como señal analítica se utiliza, tanto la altura de pico correspondiente a la máxima emisión de radiación, como el área de pico.

Se han empleado sistemas de flujo continuo con detección basada en QL, para la determinación de varios fármacos y analitos de interés biológico [33]. Asimismo, se han empleado varias reacciones quimioluminiscentes combinadas con separaciones por cromatografía líquida y, hasta la década de los noventa, la detección por QL no había sido acoplada a electroforesis capilar, pero, en estos últimos años, se han publicado importantes desarrollos por parte de algunas compañías y grupos de investigación, por lo que se esperan futuras contribuciones sobre el tema. Así, las tendencias más actuales en química analítica implican la aplicación de la QL como sistema de detección, combinada con EC como método previo de separación, proporcionando una selectividad y sensibilidad analítica excelentes y permitiendo la resolución y cuantificación de varios analitos en mezclas relativamente complejas [34].

### **III.1.5. Fluoroquinolonas y Quimioluminiscencia**

En la determinación de fluoroquinolonas empleando un sistema de inyección en flujo y detección quimioluminescente, se han empleado los sistemas cerio-sulfito, solo y sensibilizado con  $Tb^{3+}$ , permanganato-sulfito sensibilizado con  $Tb^{3+}$ , permanganato-tiosulfato, ácido peroxinitroso, luminol- $H_2O_2$ , tris-(1,10-fenantrolina) rutenio (II)-cerio (IV) y tris(2,2'-bipiridil) rutenio(II)-cerio (IV).

El sistema del cerio-sulfito se ha propuesto para la determinación de CIP [35, 36], de OFL [36, 37] y NOR [36], en preparaciones farmacéuticas. El mismo sistema, sensibilizado con  $Tb^{3+}$ , permitió bajar de los límites de detección de los métodos

propuestos para CIP [38] y NOR [39] en preparaciones farmacéuticas, ampliando el procedimiento a muestras de orina y suero.

El sistema sulfito sódico-permanganato potásico, sensibilizado con  $Tb^{3+}$ , también fue empleado para determinar OFL [40], en fármacos y orina, y el tiosulfato sódico-permanganato potásico, se empleó en la determinación de CIP en fármacos, suero y orina [41].

El sistema ácido peroxinitroso, obtenido con  $H_2O_2$  acidificado más el nitrito, fue propuesto para la determinación de CIP, NOR y OFL [42] en preparaciones farmacéuticas y el luminol- $H_2O_2$  fue empleado para la determinación de OFL [43].

El sistema tris-(1,10-fenantrolina) rutenio (II)-ácidos orgánicos-Ce (IV) fue propuesto para determinar CIP [44] y el tris(2,2'-bipiridil) rutenio(II)-Cerio (IV) para CIP, OFL y NOR [45] en preparaciones farmacéuticas, orina y plasma, y como sistema de detección de HPLC para la determinación de OFL en tejidos de pollo [46]. Desde el descubrimiento inicial de este último sistema quimioluminescente [47], su utilidad se ha explotado para distintas aplicaciones analíticas [48]. El campo común de este sistema es la producción del reactivo oxidante  $Ru(bipy)_3^{2+}$ , seguido de la reducción por una especie del analito, y la emisión de luz [48].

La quimioluminescencia resuelta en el tiempo, basada en la técnica de flujo detenido, asegura una mezcla rápida y eficiente del reactivo quimioluminescente y la muestra, inmediatamente antes de alcanzar el detector.

En este capítulo, hemos desarrollado un método QL para la determinación del CIP, NOR y OFL en preparados farmacéuticos. El método se basa en la reacción QL de estas fluoroquinolonas con  $[Ru(bipy)_3^{2+}]$  y Ce (IV), en medio ácido sulfúrico. Además, los datos quimioluminescencia-tiempo adquiridos con este sistema, permitieron el uso de técnicas de calibración multivariante, mínimos cuadrados parciales (PLS), para la resolución de las mezclas binarias de estas fluoroquinolonas. Hasta donde nosotros



sabemos, ésta es la primera vez que los datos de quimioluminiscencia resueltos en el tiempo son empleados para la resolución de las mezclas mediante análisis quimiométrico, aunque hay descrito un método quimioluminiscente resuelto en el tiempo, para la determinación simultánea de ácidos pirúvico y tartárico, basado en la reacción de  $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]^{2+}$  con Ce (IV). La resolución fue posible en este último caso, sin emplear técnicas quimiométricas, ya que el sistema del ácido pirúvico presenta la máxima intensidad quimioluminescente a los 2 s, mientras que el sistema del ácido tartárico lo hace a los 64 s [49].



## RESULTADOS Y DISCUSION



### III.2. ESTUDIOS QUIMIOLUMINISCENTES PREVIOS

Como hemos indicado en la introducción, el complejo  $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$  ha resultado ser un sistema de detección muy sensible para compuestos que contienen una amina alifática secundaria o terciaria [50]. Las fluoroquinolonas estudiadas, contienen una amina secundaria (NOR y CIP) o terciaria (OFL), en la estructura de piperazina.

Utilizando este complejo, Aly y col. [45] propusieron un mecanismo similar a uno publicado anteriormente para la determinación de aminas, utilizando su reacción quimioluminiscente con  $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$  [51], que implica la oxidación de  $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$  y de la amina secundaria, presente en CIP y NOR, y terciaria, presente en OFL, mediante el Ce (IV). El producto de oxidación de la amina sufre una desprotonación formando un radical y éste reduce al  $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{3+}$ , que pasa al estado excitado con la consecuente emisión de radiación.

- 1)  $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+} + \text{Ce (IV)} \rightarrow \text{Ru}(\text{bipy})_3^{3+} + \text{Ce (III)}$
- 2)  $\text{Fluoroquinolona} + \text{Ce (IV)} \rightarrow \text{Fluoroquinolona}^{\bullet+} + \text{Ce (III)}$
- 3)  $\text{Fluoroquinolona}^{\bullet+} \rightarrow \text{Fluoroquinolona}^{\bullet} + \text{H}^+$
- 4)  $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{3+} + \text{Fluoroquinolona}^{\bullet} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow [\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}]^* + \text{fragmentos de fluoroquinolonas} + \text{H}^+$
- 5)  $[\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}]^* \rightarrow \text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+} + h\nu$

En los estudios previos, se estudió la oxidación de las fluoroquinolonas empleando permanganato potásico como oxidante, pero la reacción quimioluminiscente era más lenta y la intensidad de emisión menor. Cuando empleamos ácido nítrico para fijar el medio ácido, las señales obtenidas no fueron reproducibles.

### III.2.1. Montaje empleado

El montaje de flujo continuo empleado para aplicar el sistema de flujo detenido se muestra en la Figura III.8. Los reactivos (la disolución de fluoroquinolona, Ce (IV) y  $[\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}]$ ) son bombeados a través del sistema de tres vías por una bomba peristáltica Wilson Minipuls-3, controlada por un ordenador. El flujo empleado fue de  $10.5 \text{ mL min}^{-1}$  y los reactivos circulaban por unos tubos de poli(tetrafluoroetileno) (PTFE) (Tygon, 0.5 mm de diámetro interno y resistentes a los ácidos), mezclándose en la celda del detector. El flujo se detenía a un tiempo adecuado y los datos de quimioluminiscencia-tiempo se recogían con el detector CL-2 Camspec Chemiluminescence. El detector estaba conectado al ordenador mediante un convertidor analógico/digital y los datos se adquirieron mediante el programa CSW32 y se procesaron con el programa Camspec4, desarrollado por J. A. Murillo y col., en la Universidad de Castilla la Mancha.

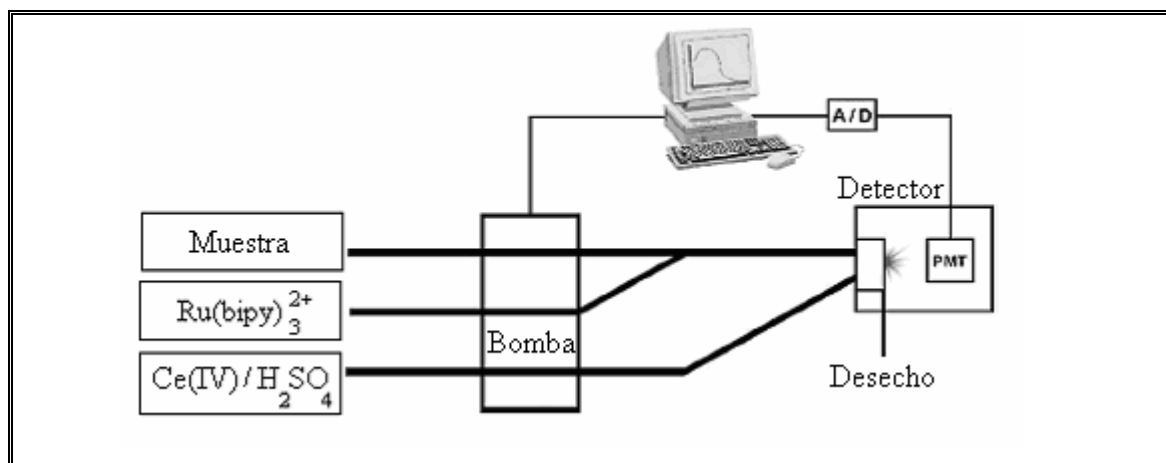


Figura III.8. Sistema de flujo continuo empleado.

La disolución de la fluoroquinolona en estudio, se mezclaba en primer lugar con una disolución de  $[\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}]$  y la mezcla resultante convergía con una disolución de Ce (IV) (en  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) en la entrada de la celda de reacción, que como ya hemos indicado anteriormente es una celda en espiral, en el detector. En ese momento, el flujo se detenía

durante tres minutos, registrándose la señal continuamente y obteniéndose una gráfica de intensidad quimioluminiscente frente al tiempo. Todas las medidas se realizaron a temperatura ambiente (18-20 °C).

Comenzamos estudiando la influencia de los distintos parámetros químicos e instrumentales en las propiedades quimioluminiscentes de los analitos estudiados. Cada muestra se ensayó por triplicado y se midieron la emisión máxima y el área total de emisión (durante tres minutos) y se realizaron los calibrados para cada analito, con objeto de determinarlos en muestras farmacéuticas. Los métodos propuestos fueron validados mediante HPLC.

### III.3. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES QUÍMICAS Y PARÁMETROS INSTRUMENTALES

#### III.3.1. Influencia de la concentración de ácido sulfúrico

La sal de Ce (IV) no se puede disolver en agua a pH neutro, por lo que se estudió el efecto de la concentración de ácido sulfúrico, necesario para preparar la disolución de Ce (IV), en la emisión quimioluminiscente (intensidad máxima y área) de los analitos. Para ello, se emplearon disoluciones de  $[\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}]$  0.5 mM, Ce (IV) 1.5 mM y disoluciones de CIP, NOR y OFL de  $7.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $7.0 \mu\text{g mL}^{-1}$  y  $1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente, y concentraciones variables de ácido sulfúrico entre 0.25 y 4.0 M. Se registraron las curvas de desarrollo de quimioluminiscencia y se midieron la intensidad máxima (Figura III.9.A) y el área (Figura III.9.B), en cada caso.

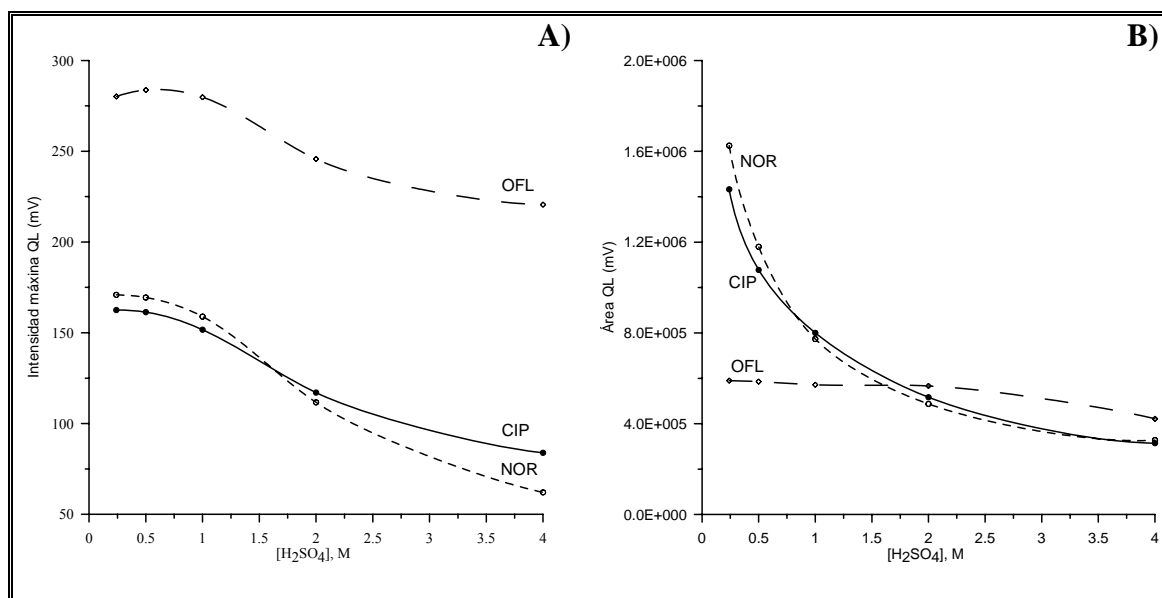


Figura III.9. Influencia de la concentración de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  en la Intensidad máxima de QL, (A) y el Área QL, (B).



En la Figura III.9.A) se observa que la intensidad máxima de QL, en todos los casos, disminuye al aumentar la concentración de ácido, siendo máxima y constante, para concentraciones de ácido sulfúrico próximas a 0.5 M.

Como podemos observar en la Figura III.9.B), el área de emisión, en el caso del CIP y del NOR, también disminuye al aumentar la concentración de ácido, mientras que en el caso del OFL se mantiene prácticamente constante, disminuyendo ligeramente para los valores de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ensayados más elevados. A la vista de estas experiencias, seleccionamos una concentración óptima de ácido sulfúrico de 0.5 M.

### **III.3.2. Influencia de la concentración de Ce (IV)**

Se estudió la influencia de la concentración de oxidante en la quimioluminiscencia. Para ello, se emplearon disoluciones de [Ru(bipy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>] 0.5 mM y disoluciones de CIP, NOR y OFL de 7.0 µg mL<sup>-1</sup>, 7.0 µg mL<sup>-1</sup> y 1.0 µg mL<sup>-1</sup>, respectivamente, y concentraciones variables de Ce (IV) entre 0.5 y 3.1 mM en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5 M. Se registraron las curvas de desarrollo de quimioluminiscencia y se midieron la intensidad máxima (Figura III.10.A) y el área (Figura III.10.B), en cada caso.

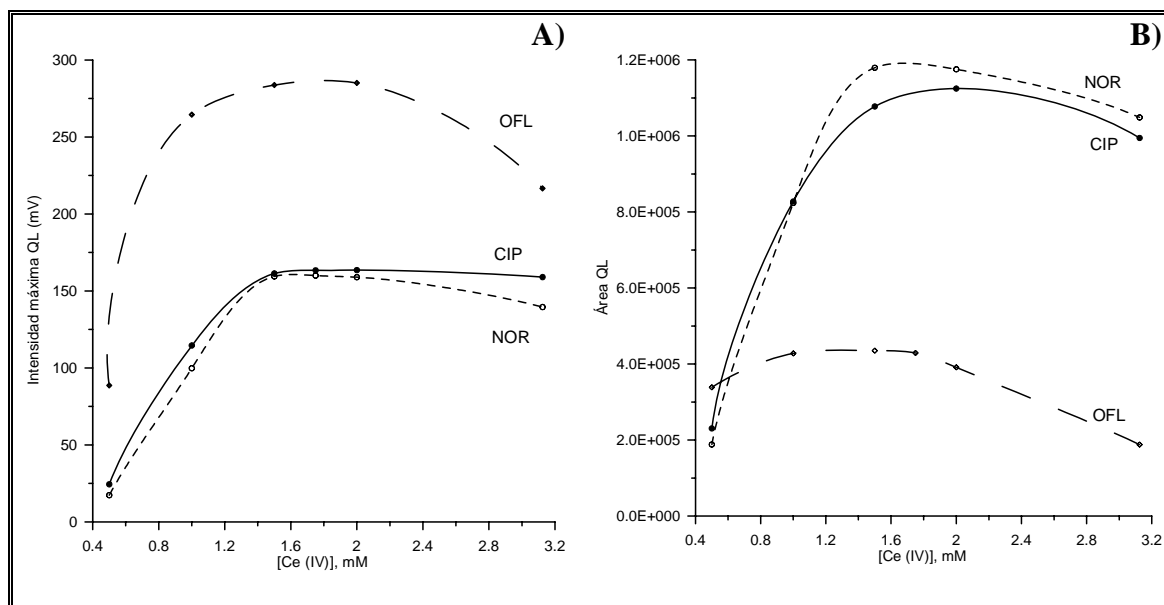


Figura III.10. Influencia de la concentración de Ce (IV) en la Intensidad máxima de QL, (A) y el Área QL, (B).

En la Figura III.10.A observamos que la intensidad máxima de QL es máxima y constante a partir de Ce (IV) 1.5 mM, disminuyendo en el caso de OFL a partir de Ce (IV) 2.2 mM. En el caso del área (Figura III.10.B.), observamos el mismo comportamiento que para la intensidad máxima.

Seleccionamos una concentración óptima de Ce (IV) de 1.75 mM por proporcionarnos la máxima señal QL, dentro de la zona constante.

### III.3.3. Influencia de la concentración de $Ru(bipy)_3^{2+}$

Una vez optimizadas las concentraciones de ácido y de Ce (IV), se estudió la influencia de la concentración de  $Ru(bipy)_3^{2+}$  (en el intervalo 0.2-1.7 mM) en la emisión quimioluminiscente. Se emplearon disoluciones de CIP, NOR y OFL de  $7.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $7.0 \mu\text{g mL}^{-1}$  y  $1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente, y de Ce (IV) 1.75 mM en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.5 M. Se

registraron las curvas de desarrollo de quimioluminiscencia y se midieron la intensidad máxima (Figura III.11.A) y el área (Figura III.11.B), en cada caso.

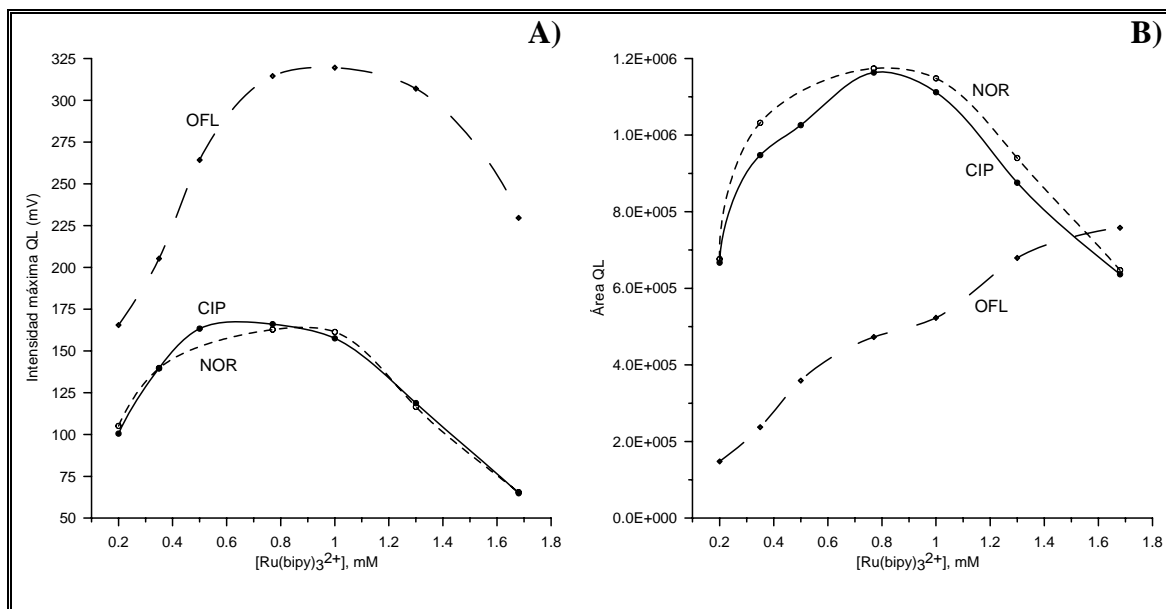


Figura III.11. Influencia de la concentración de  $Ru(bipy)_3^{2+}$  en la Intensidad máxima de QL, (A) y el Área QL, (B).

En la Figura III.11.A) observamos que la intensidad máxima de QL es máxima y constante, en el caso del CIP y NOR, entre  $Ru(bipy)_3^{2+}$  0.5 y 1.0 mM, y para el OFL entre 0.7 y 1.2 mM. En la Figura III.11.B) observamos un comportamiento similar para el CIP y el NOR, mientras que en el caso del OFL, aumenta el área QL con la concentración de  $Ru(bipy)_3^{2+}$ .

Seleccionamos una concentración óptima de  $Ru(bipy)_3^{2+}$  de 0.8 mM, por proporcionarnos la máxima señal QL, dentro de la zona constante (excepto para el OFL al medir el área QL).

### **III.3.4. *Influencia de velocidad de flujo en la intensidad QL***

La velocidad de la bomba es un parámetro importante que hay que ajustar, ya que influye en la detección QL debido a que, el tiempo empleado en transferir el producto excitado a la celda de flujo, es crítico en la detección de la radiación emitida [52]. Velocidades de flujo demasiado altas o bajas pueden provocar la disminución, e incluso la desaparición, de QL en la celda de detección.

Se fijó una velocidad óptima de flujo de 10.5 mL/min.

### III.4. CURVAS DE CALIBRADO

En primer lugar y utilizando las condiciones químicas e instrumentales óptimas indicadas en la Tabla III.2, establecimos la linealidad de la Intensidad máxima QL de los tres analitos, que fue de  $1.3\text{-}30\ \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $1.4\text{-}43\ \mu\text{g mL}^{-1}$  y  $0.7\text{-}15\ \mu\text{g mL}^{-1}$  para el CIP, NOR y OFL, respectivamente. En el caso del área QL, los intervalos lineales fueron de  $1.8\text{-}30\ \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $2.5\text{-}43\ \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $0.6\text{-}15\ \mu\text{g mL}^{-1}$  para el CIP, NOR y OFL, respectivamente, empleando 8 patrones y 3 réplicas por cada patrón en ambos casos.

Tabla III.2. Condiciones experimentales óptimas.

$[\text{H}_2\text{SO}_4], \text{mM}$	Ce (IV), mM	$[\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}], \text{mM}$	Vel. Flujo, mL/min
0.5	1.75	0.8	10.5

En las Figuras III.12, III.13 y III.14 se muestran algunas curvas de desarrollo de quimioluminiscencia, para el CIP, NOR y OFL.

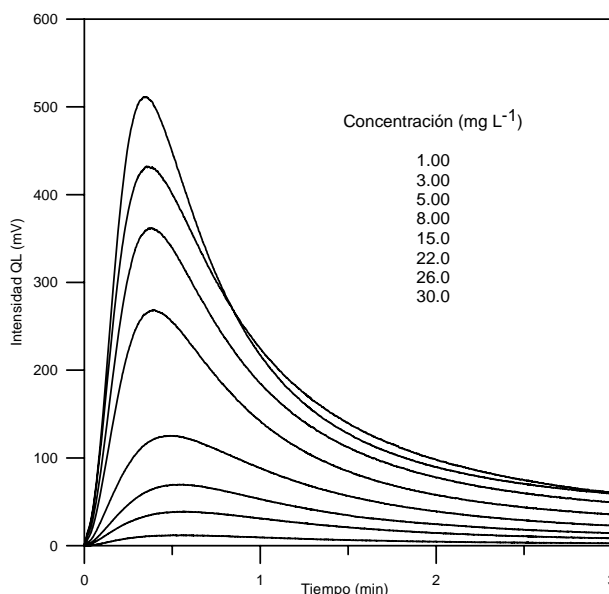


Figura III.12. Curvas de desarrollo de la QL para distintas concentraciones de CIP con 1.75 mM Ce (IV) en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.5 M y  $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$  0.8 mM.

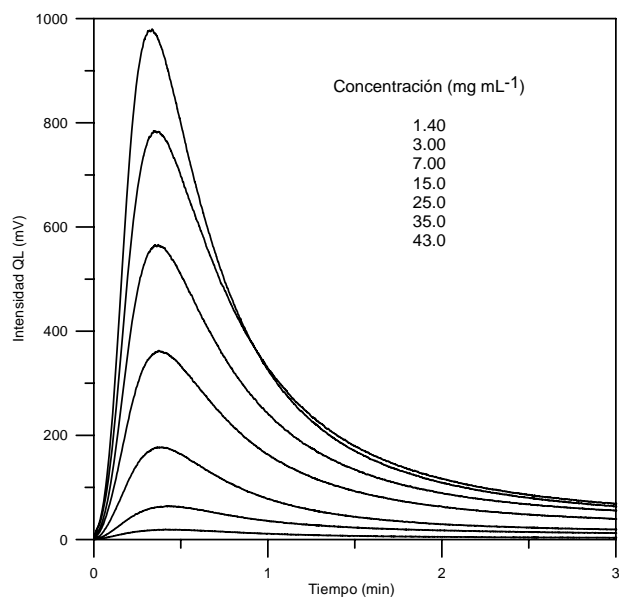


Figura III.13. Curvas de desarrollo de la QL para distintas concentraciones de NOR con 1.75 mM Ce (IV) en  $H_2SO_4$  0.5 M y  $Ru(bipy)_3^{2+}$  0.8 mM.

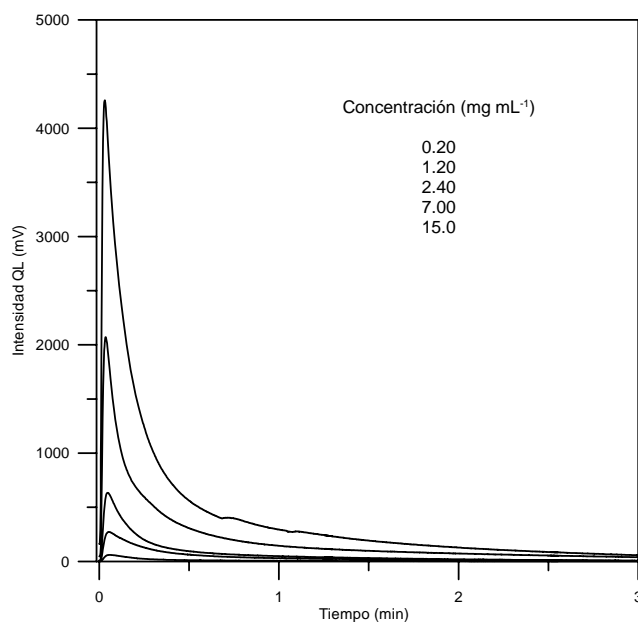
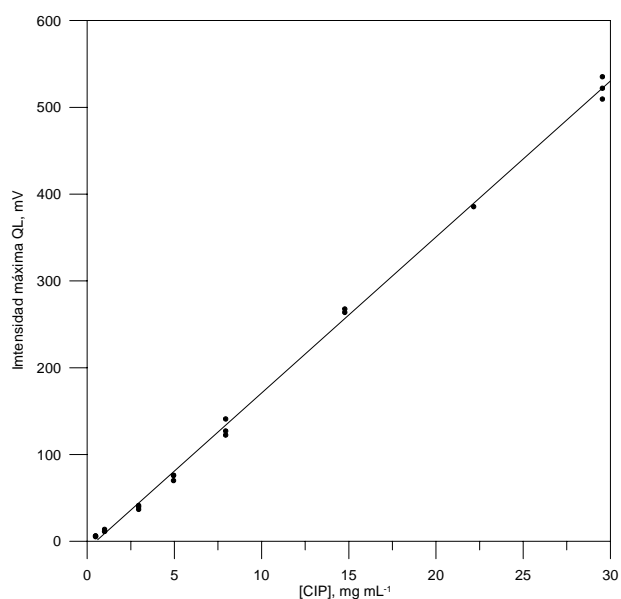


Figura III.14. Curvas de desarrollo de la QL para distintas concentraciones de OFL con 1.75 mM Ce (IV) en  $H_2SO_4$  0.5 M y  $Ru(bipy)_3^{2+}$  0.8 mM.

La curva de calibrado, para el CIP, obtenida determinando la intensidad máxima de QL, se muestra en la Figura III.15. En ambas curvas ( $I_{\text{máx}}$  y área QL) se ha realizado un ajuste lineal mediante mínimos cuadrados, cuyos parámetros estadísticos se resumen en la Tabla III.3.

Para realizar las regresiones y calcular sus parámetros estadísticos y de calidad, se utilizó el programa informático ACOC [53].



*Figura III.15. Recta de calibrado para el CIP determinando la intensidad máxima de QL.*

*Tabla III.3. Parámetros estadísticos de las rectas de calibrado para la determinación de las fluoroquinolonas con los métodos propuestos.*

	CIP		NOR		OFL	
	I. máxima	Área	I. máxima	Área	I. máxima	Área
Intervalo Lineal ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	1.3 - 30	1.8 - 30	1.4 - 43	2.5 - 43	0.7 - 15	0.6 -15
Coefficiente de correlación	0.999	0.997	0.999	0.998	0.998	0.999
Linealidad (%)	99	98	99	99	99	99
Sensibilidad analítica*, $\gamma^{-1}$ ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	0.43	0.51	0.47	0.81	0.20	0.17
LOD** ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	0.96	1.19	1.05	1.84	0.48	0.40
LOD*** ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	0.40	0.53	0.42	0.76	0.21	0.17

\* [54]

\*\* Clayton y col. ( $\alpha = \beta = 0.05$ ) [55]

\*\*\* Long y Winefordner ( $k = 3$ ) [56]

Además de la extensión del rango lineal obtenido al medir la intensidad máxima QL, observamos que son más favorables el resto de los parámetros obtenidos.



### III.5. ESTUDIO DE INTERFERENCIAS Y APLICACIONES

Para poder aplicar los métodos propuestos en la determinación de estas fluoroquinolonas en preparados farmacéuticos, en primer lugar, se estudió el efecto de algunos excipientes usados comúnmente (citrato, manitol, lactosa, sacarosa, glucosa y almidón).

Se prepararon disoluciones de  $15 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$  y  $7.0 \mu\text{g mL}^{-1}$  de CIP, NOR y OFL en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  5.0 mM, respectivamente, conteniendo excipiente en una relación 50:1, m:m (excipiente:fluoroquinolona) y se registró el desarrollo de la QL bajo las condiciones fijadas de la Tabla III.2. Cada ensayo se realizó por triplicado.

En la Tabla III.4 se muestran las recuperaciones obtenidas para las distintas sustancias ensayadas, midiendo la intensidad máxima y el área QL durante los tres minutos iniciales.

Tabla III.4. Estudio de interferencias.

Excipiente	Recuperación (% $\pm$ SD)					
	CIP		NOR		OFL	
	I. máxima	Área	I. máxima	Área	I. máxima	Área
Citrato	101 $\pm$ 2	101 $\pm$ 2	101 $\pm$ 1	90 $\pm$ 1	100 $\pm$ 2	105 $\pm$ 3
Manitol	103 $\pm$ 3	100 $\pm$ 3	101 $\pm$ 1	100 $\pm$ 4	98 $\pm$ 3	102 $\pm$ 3
Lactosa	102 $\pm$ 4	100 $\pm$ 4	98 $\pm$ 1	98 $\pm$ 1	99 $\pm$ 2	97 $\pm$ 2
Sacarosa	102 $\pm$ 4	96 $\pm$ 1	101 $\pm$ 2	101 $\pm$ 3	98 $\pm$ 2	101 $\pm$ 2
Glucosa	104 $\pm$ 3	99 $\pm$ 1	99 $\pm$ 1	101 $\pm$ 3	103 $\pm$ 1	102 $\pm$ 3
Almidón	98 $\pm$ 6	99 $\pm$ 4	98 $\pm$ 2	100 $\pm$ 2	99 $\pm$ 2	101 $\pm$ 3

Se comprobó que los excipientes ensayados no interferían en la determinación de las fluoroquinolonas estudiadas en, al menos, una relación excipiente:fluoroquinolona 50:1, obteniéndose porcentajes de recuperación en todos los casos entre el 90 y 105 %.

Los métodos desarrollados se aplicaron para determinar las fluoroquinolonas estudiadas en diferentes preparados farmacéuticos. Para el análisis de Catex<sup>®</sup> 250 (IFC) y Cunesin 250 (Recordati), se pesó una cantidad de medicamento que contenía 225 mg de CIP. En el caso del Amicrobín (Quimifar) y Esclebin<sup>®</sup> (Lab. Alacan), se pesó una cantidad que contenía 400 mg de NOR y, para el análisis de Surnox 200 (Aventis) y Oflovir (Vir) una cantidad equivalente a 100 mg de OFL. Los medicamentos se diluyeron dos veces con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5x10<sup>-3</sup> M, hasta obtener concentraciones finales de 15 µg mL<sup>-1</sup>, 20 µg mL<sup>-1</sup> y 10 µg mL<sup>-1</sup> de CIP, NOR y OFL, respectivamente. Para el análisis de Ciproxina Simple (Alcon Cusi), Chibroxin (Thea) y Exocin<sup>®</sup> 0.3 % (Allergan), se tomaron 7 mL en el primer caso, y 0.5 mL en los otros dos, y se diluyeron hasta 25 mL con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5x10<sup>-3</sup> M, aplicando el método descrito anteriormente. El contenido de cada medicamento se calculó empleando las rectas de calibración obtenidas para cada fluoroquinolona (Tabla III.3).

En la Tabla III.5 se muestran las recuperaciones obtenidas, calculando la media de tres determinaciones individuales, suponiendo que los preparados contienen la cantidad indicada por los laboratorios. En todos obtenemos resultados satisfactorios, con valores de recuperación entre el 99 y 103 %.

Los resultados obtenidos se validaron con un método basado en HPLC [57], ligeramente modificado por nosotros, con detección UV-Visible, seleccionando una longitud de onda de 280 nm para la determinación de las fluoroquinolonas. Empleamos una fase móvil constituida por una mezcla de tres disoluciones, un 75 % A, un 10% de B y 15 % de C; siendo A tampón ácido fórmico/formiato de pH 3.0, 100 mmol/L, B acetonitrilo y C metanol.

Se prepararon disoluciones de 50 µg mL<sup>-1</sup> de las fluoroquinolonas en metanol, y mediante dilución en la fase móvil se prepararon disoluciones de diferente concentración, que se inyectaron tres veces en el cromatógrafo y se construyeron las curvas de calibración de cada fluoroquinolona, midiendo la altura y el área de pico.

El análisis de los preparados farmacéuticos se llevó a cabo disolviendo las tabletas o cápsulas en 100 mL de metanol (agitando e introduciendo en el ultrasonido durante 15 minutos), siendo la concentración final de  $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ , que se filtró a través de membranas de nylon de tamaño de poro de  $0.22 \mu\text{m}$ . Estas disoluciones se diluyeron con fase móvil hasta obtener una concentración final de  $5.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Este tratamiento se realizó en tres tabletas o cápsulas de cada fármaco, y cada muestra se inyectó por triplicado. Las disoluciones de Ciproxina Simple, Chibroxin y Exocin 0.3 % se prepararon diluyendo 1 mL del fármaco en 100 ml de metanol. Posteriormente, cada muestra se diluyó con fase móvil hasta obtener una concentración final de  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  que se filtró también a través de las membranas de nylon, y se inyectaron por triplicado en el cromatógrafo.

Tabla III.5. Determinación de CIP, NOR y OFL en preparados farmacéuticos.

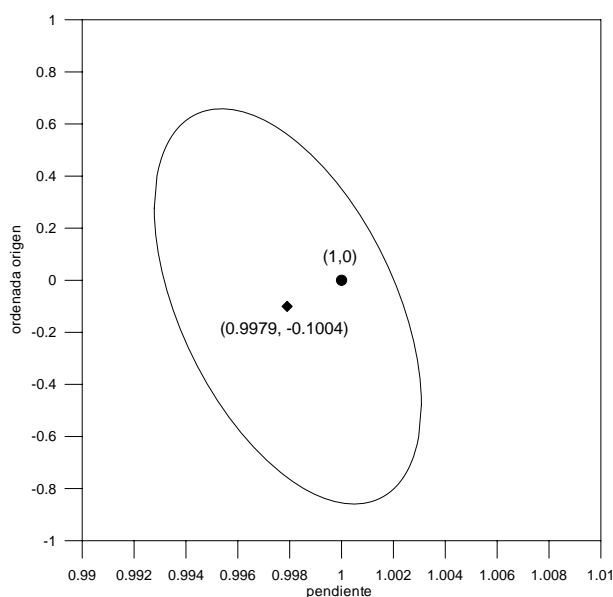
	Preparado	Composición	Recuperación (% $\pm$ SD)			
			QL		HPLC	
			Imax	Área	Imax	Área
<b>CIP</b>	CIPROXINA Simple	3 mg/mL	$102 \pm 3$	$103 \pm 4$	$103 \pm 1$	$97 \pm 1$
	CATEX	250 mg/tableta	$101 \pm 1$	$102 \pm 2$	$101 \pm 7$	$98 \pm 4$
	CUNESIN	250 mg/tableta	$102 \pm 1$	$99 \pm 2$	$103 \pm 4$	$98 \pm 3$
<b>NOR</b>	AMICROBÍN	400 mg/tableta	$102 \pm 1$	$103 \pm 4$	$96 \pm 1$	$99 \pm 1$
	ESCLEBIN	400 mg/tableta	$100 \pm 1$	$102 \pm 2$	$93 \pm 1$	$97 \pm 1$
	CHIBROXIN	3 mg/mL	$99 \pm 1$	$99 \pm 2$	$96 \pm 1$	$100 \pm 1$
<b>OFL</b>	EXOCIN 0.3 %	3 mg/mL	$100 \pm 1$	$103 \pm 2$	$102 \pm 1$	$103 \pm 1$
	SURNOX 200	200 mg/tableta	$103 \pm 2$	$98 \pm 3$	$96 \pm 1$	$96 \pm 1$
	OFLOVIR	200 mg/tableta	$101 \pm 1$	$96 \pm 1$	$101 \pm 1$	$102 \pm 1$

Se compararon los resultados obtenidos con los dos métodos, QL y HPLC, con objeto de comprobar si existen diferencias estadísticamente significativas en las predicciones realizadas con cada uno de ellos. Para ello se compararon las predicciones obtenidas al calcular la Imax de QL y el área en HPLC.

En nuestro estudio, utilizamos un criterio gráfico basado en un método de regresión lineal que se llevó a cabo empleando los datos de concentración de los tres analitos simultáneamente, para todos los medicamentos empleados mostrados en la

Tabla III.5, tal y como se recomienda en la literatura [58] para obtener mejores estimaciones de los errores experimentales. La pendiente,  $b$ , y la ordenada en el origen,  $a$ , calculadas, se compararon con los valores ideales 1 y 0 mediante el test de confianza para la pendiente y la ordenada en el origen, EJCR (elliptical joint confidence region) [59]. Aplicamos este test con ayuda del programa informático ACOC, para un nivel de confianza del 95 %.

En la Figura III.16. observamos la elipse de la verdadera pendiente (0.9979) y ordenada en el origen (-0.1004) al comparar ambos métodos.



*Figura III.16. Región de confianza para la verdadera pendiente y ordenada en el origen al comparar las predicciones obtenidas mediante QL y HPLC.*

La pendiente y ordenada en el origen teóricas (1, 0) están dentro de la elipse y, por tanto, no difieren significativamente de las estimadas (0.9979, -0.1004), por lo que concluimos que, al comparar las predicciones obtenidas con ambos métodos, no existen diferencias estadísticamente significativas, para el nivel de confianza elegido.

### III.6. DETERMINACIÓN DE MEZCLAS BINARIAS DE FLUOROQUINOLONAS EN PROBLEMAS SINTÉTICOS MEDIANTE CALIBRACIÓN MULTIVARIANTE DE PRIMER ORDEN

Para llevar al cabo el análisis de mezclas binarias de ofloxacino-norfloxacino y ofloxacino-ciprofloxacino se empleó un método de calibración multivariante de primer orden, basado en mínimos cuadrados parciales, PLS-1. Las mezclas binarias ciprofloxacino-norfloxacino, así como las ternarias, no pudieron abordarse debido a la similitud de los perfiles quimioluminiscentes, resuelto en el tiempo, de sendos analitos.

En la Figura III.17 se muestran los perfiles quimioluminiscentes de las mezclas binarias OFL-NOR y OFL-CIP, donde podemos comprobar la aditividad de las señales bajo las condiciones químicas e instrumentales previamente optimizadas.

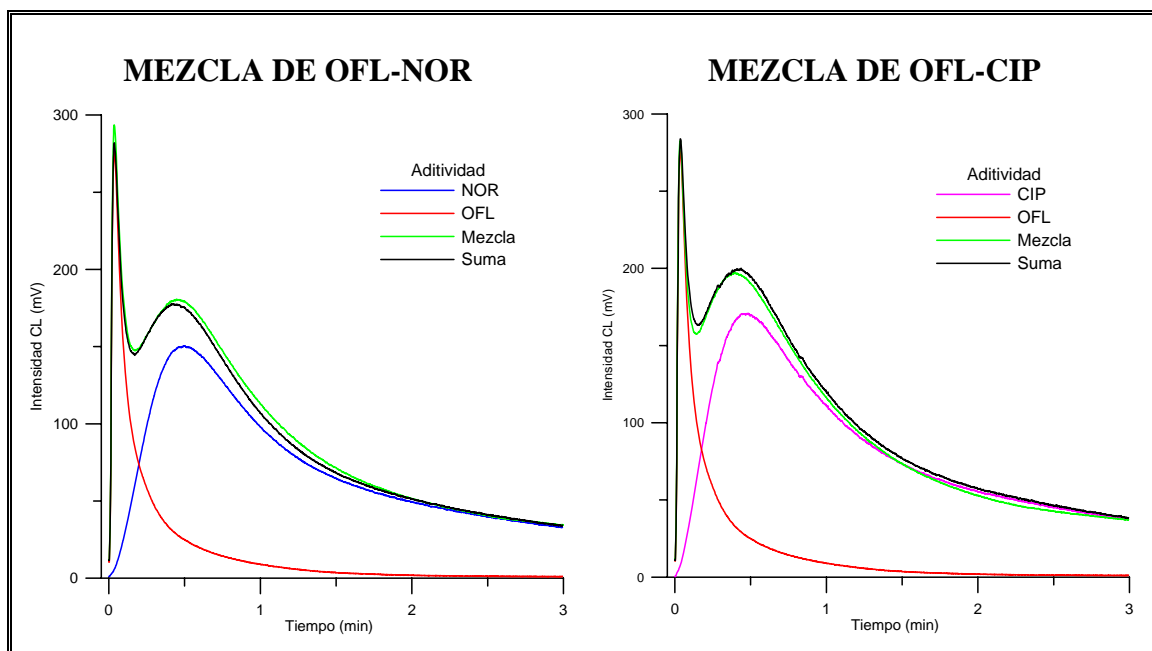


Figura III.17. Curvas de desarrollo de la QL para las mezclas binarias estudiadas. [Cip]: 7.2 ppm, [NOR]: 6.3 ppm y [OFL]: 0.98 ppm.

### III.6.1. Matriz de calibración y conjunto de predicción

A partir de los intervalos de linealidad previamente obtenidos, empleamos concentraciones de nuestros analitos entre 0-30  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 0-40  $\mu\text{g mL}^{-1}$  y 0-20  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para el CIP, NOR y OFL, respectivamente, para construir las matrices de calibración. Para ello, utilizaremos un diseño que combina el factorial de tres niveles y el diseño central compuesto, el número de patrones necesarios para la construcción de esta matriz fue de 13.

En la Tabla III.6 se recogen los valores de concentración empleados en la matriz de calibración y en las muestras de predicción.

Tabla III.6. Composición de la matriz de calibración y el conjunto de predicción.

<b>Mezclas binarias (<math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>)</b>			
[OFL]	[CIP]	[OFL]	[NOR]
Conjunto de calibración			
2.19	4.44	2.92	5.85
7.50	4.44	9.94	5.85
12.8	4.44	17.0	5.85
2.19	14.9	17.0	20.0
7.50	14.9	9.94	20.0
12.8	14.9	17.0	20.0
2.19	25.7	2.92	34.1
7.50	25.7	9.94	34.1
12.8	25.7	17.0	34.1
0	14.9	0	20.0
14.9	14.9	20.3	20.0
7.50	0	9.94	0
7.50	29.7	9.94	40.1
Conjunto de predicción			
10.6	3.61	15.2	16.0
5.78	16.5	4.06	24.0
8.97	11.7	9.53	23.2
3.59	24.2	9.53	38.9
15.0	27.0	3.65	17.2

Para cada uno de los patrones, así como para las muestras de predicción, se registró el desarrollo de la QL por duplicado y se calculó la curva media. En la Figura III.18. se observan los perfiles de todos los patrones de calibración.

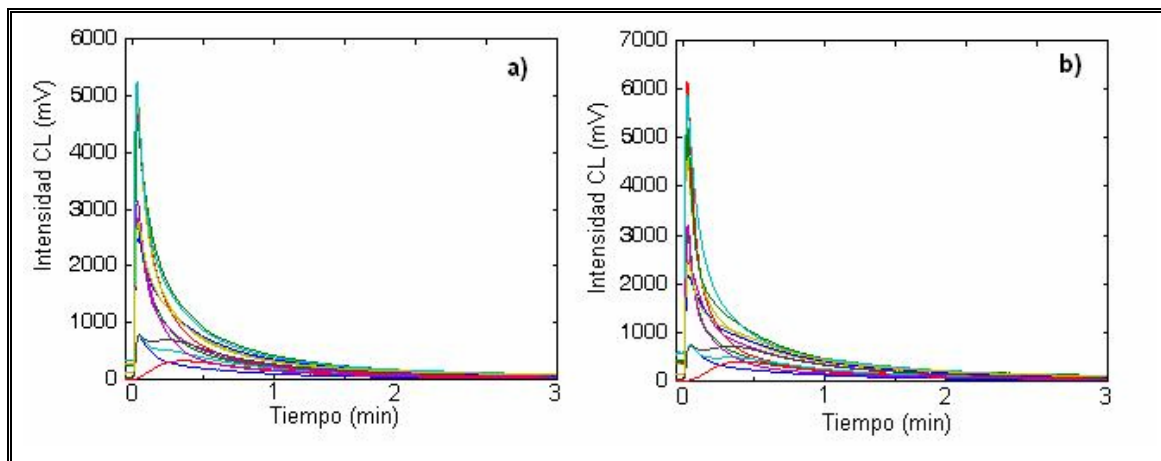


Figura III.18. Curvas de desarrollo de la QL correspondientes a las muestras que componen las matrices de calibración para la resolución de las mezclas OFL-CIP a) y OFL-NOR b).

### III.6.2. Optimización del modelo PLS y aplicaciones

Para optimizar el modelo de calibración, se hizo uso del programa MVC1 (Multivariate Calibration for First-Order), programado bajo el entorno Matlab 5.3 por A. C. Olivieri y col. [60].

Este programa nos permite llevar a cabo calibración multivariante de primer orden, mediante diversos algoritmos tales como PCR, PLS y otros basados en la señal neta del analito, como HLA/GO. Además, permite llevar a cabo validaciones cruzadas, calibración y predicción de muestras desconocidas, proporcionándonos los límites de confianza para las concentraciones calculadas, la sensibilidad y selectividad del método aplicado. También nos permite obtener la señal neta para el analito, residuos espectrales, factores espectrales, coeficientes de regresión final y scores.

El programa MVC1 puede trabajar en entorno Windows. Tiene una presentación muy sencilla que permite su fácil utilización, Figura III.19. Requiere que los espectros del conjunto de calibración sean registrados en formato ASCII, bien en una columna, en dos columnas, o en forma de matriz. Los datos no deben tener ningún tipo de cabecera. Además, el punto decimal debe ser un punto y no una coma, ya que en Matlab una coma indica una fila en una matriz.

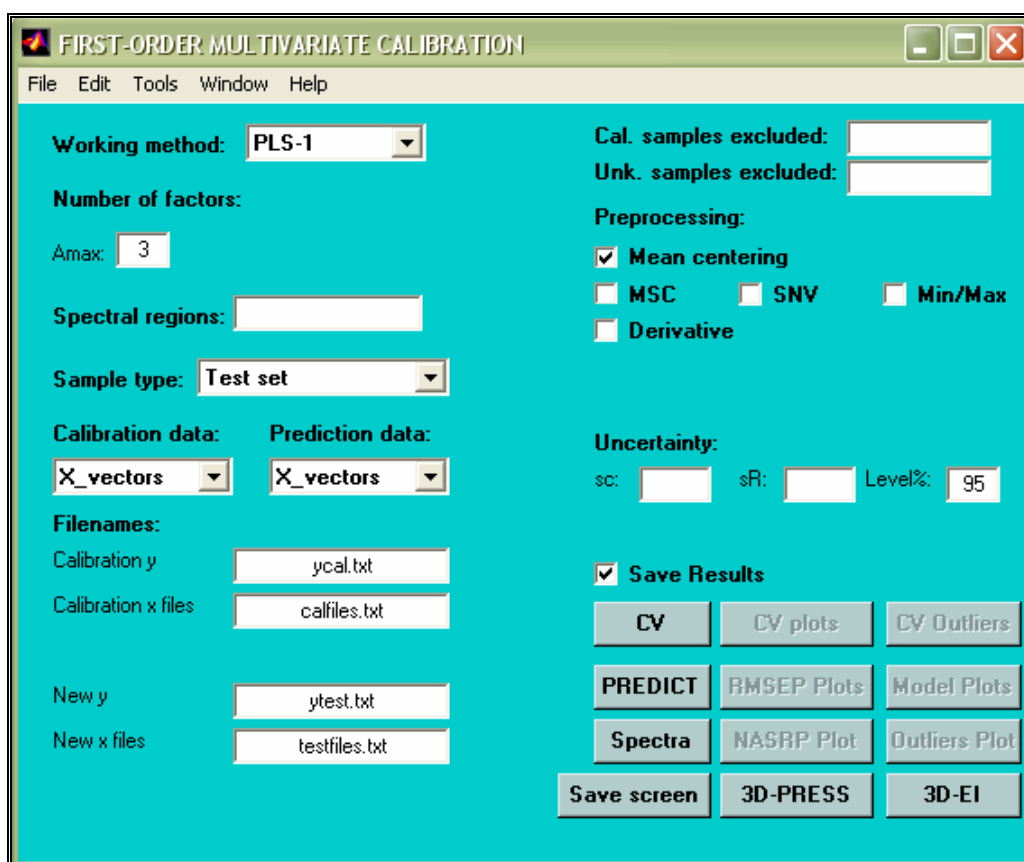


Figura III.19. Pantalla principal del programa MVC1.

Se optimizó el intervalo de tiempos de la curva QL para cada analito. Para ello, se realizó la validación cruzada y se analizó el coeficiente de determinación,  $R^2$ , y el PRESS (suma de los cuadrados de los errores residuales). En la mezcla OFL+CIP se seleccionó la zona entre 0 y 0.138 min, para el OFL (incluida en el recuadro rojo de la Figura III.20..A) y entre 0.138 y 1.496, min para el CIP (incluida en el recuadro verde de la Figura III.20..A). En la mezcla OFL+NOR se seleccionó la zona entre 0 y 0.199



min, para el OFL (incluida en el recuadro rojo de la Figura III.20..B) y entre 0.178 y 1.597 min, para el NOR (incluida en el recuadro verde de la Figura III.20..B). La resolución fue de 0.001 min.

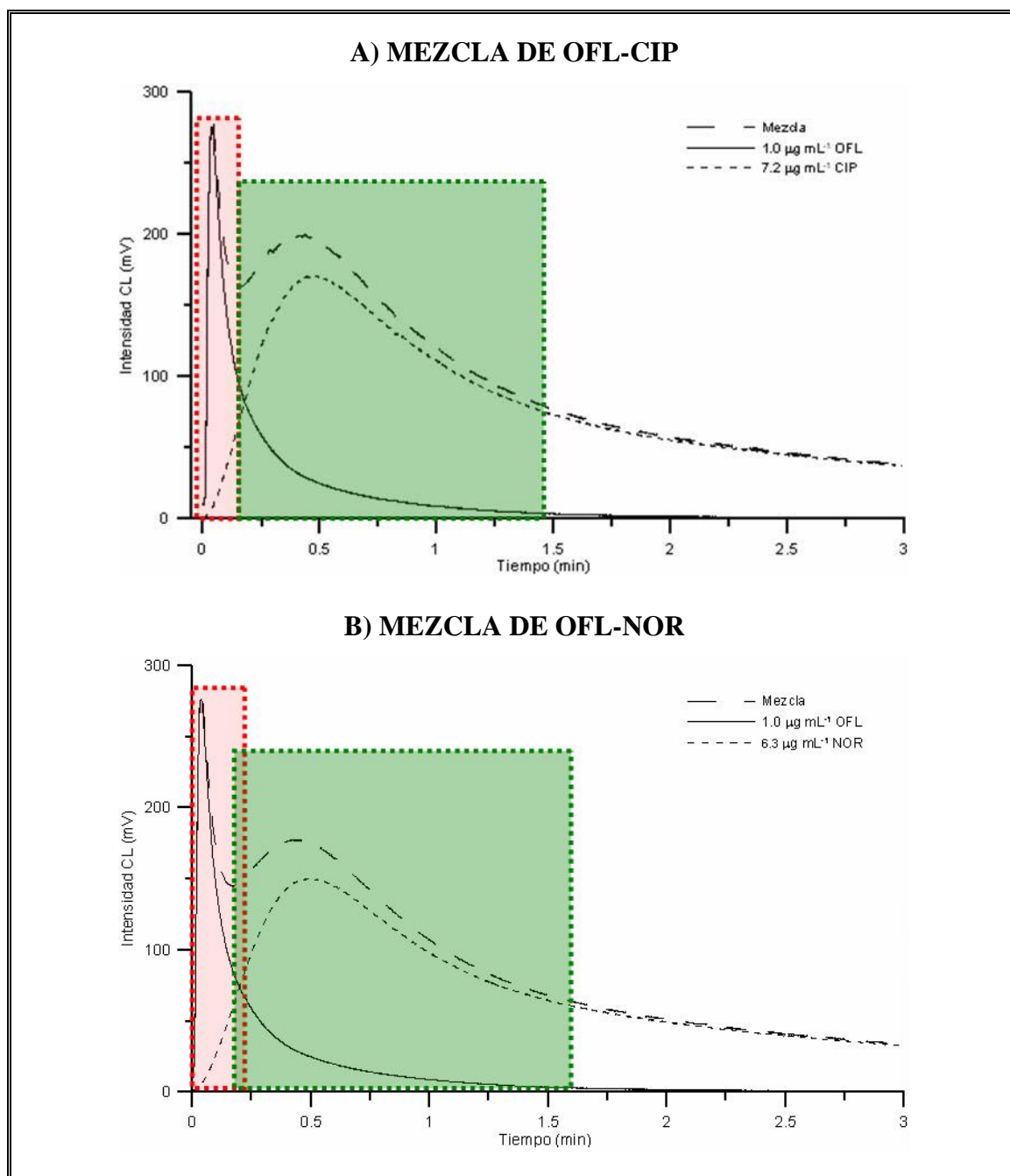


Figura III.20. Intervalos de tiempos óptimos para realizar la determinación de cada analito en las dos mezclas mediante PLS.

Seleccionamos un número óptimo de factores de 2 en todos los casos, correspondiente al primer valor de PRESS cuya probabilidad para la razón F es menor que 0.75, de acuerdo con el criterio de Haaland y Thomas [61, 62].

Las matrices optimizadas mediante PLS-1 se aplicaron a la determinación de muestras de las mezclas binarias. En la Tabla III.7 se muestran las recuperaciones y los parámetros estadísticos obtenidos, donde podemos observar resultados satisfactorios en todos los casos, por lo que podemos concluir que el método de primer orden aplicado, PLS-1, resuelve satisfactoriamente las mezclas de fluoroquinolonas estudiadas.

Tabla III.7. Aplicación del modelo PLS optimizado a la determinación de mezclas de fluoroquinolonas en muestras sintéticas.

<b>Mezcla binaria CIP-OFL</b>					
<b>CIPROFLOXACINO</b>			<b>OFLOXACINO</b>		
Actual ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Predicha ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	% R	Actual ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Predicha ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	% R
3.61	4.43	123	10.6	10.1	95
16.5	13.6	83	5.78	6.35	110
11.7	13.0	112	8.97	9.39	105
24.2	23.5	97	3.59	3.74	104
27.0	26.6	98	15.0	15.4	102
Valor medio $\pm$ SD		<b>103 <math>\pm</math> 15</b>	Valor medio $\pm$ SD		<b>103 <math>\pm</math> 5</b>
Parámetros estadísticos					
<sup>a</sup> RMSEP		<b>1.5</b>	<sup>a</sup> RMSEP		<b>0.4</b>
<sup>b</sup> REP, %		<b>9.0</b>	<sup>b</sup> REP, %		<b>4.8</b>
FACTORES		<b>2</b>	FACTORES		<b>2</b>
<b>Mezcla binaria NOR-OFL</b>					
<b>NORFLOXACINO</b>			<b>OFLOXACINO</b>		
Actual ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Predicha ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	% R	Actual ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Predicha ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	% R
16.0	17.3	108	15.2	14.4	95
24.0	22.0	92	4.06	3.83	95
23.2	23.1	99	9.53	9.75	102
38.9	34.8	90	9.53	9.62	101
17.2	17.7	103	3.65	3.19	87
Valor medio $\pm$ SD		<b>98 <math>\pm</math> 7</b>	Valor medio $\pm$ SD		<b>96 <math>\pm</math> 6</b>
Parámetros estadísticos					
<sup>a</sup> RMSEP		<b>2.1</b>	<sup>a</sup> RMSEP		<b>0.4</b>
<sup>b</sup> REP, %		<b>8.9</b>	<sup>b</sup> REP, %		<b>5.1</b>
FACTORES		<b>2</b>	FACTORES		<b>2</b>

<sup>a</sup>RMSEP: Raíz cuadrada de la media de los errores de predicción al cuadrado.

$$\text{RMSEP} = \sqrt{\frac{1}{(I-1) \cdot \sum_1^I (C_{act} - C_{pred})^2}}, \text{ siendo } I=5.$$

<sup>b</sup>REP, %: Error relativo de predicción, calculado como  $100 \times \text{RMSEP} / \bar{C}$ , siendo  $\bar{C}$  la concentración media.

### III.7. CONCLUSIONES

Hemos estudiado la reacción quimioluminiscente entre las fluoroquinolonas norfloxacino, ofloxacino y ciprofloxacino y Ce (IV), en presencia de tris(2,2'-bipyridil) rutenio(II), empleando la técnica de stopped-flow y se ha propuesto un método quimioluminiscente simple, rápido y sensible para su determinación en fármacos. Además, como se ha descrito, no se observa ninguna interferencia de excipientes comunes en preparaciones comerciales y los resultados obtenidos están de acuerdo con los obtenidos por un método de HPLC, indicando que el método quimioluminiscente propuesto es adecuado para el análisis de estas fluoroquinolonas en fármacos. Este método no requiere una instrumentación sofisticada y se podría utilizar extensamente en el control de calidad rutinario de los fluoroquinolonas, en el análisis de preparaciones farmacéuticas.

Por lo que sabemos, ésta es la primera vez que las señales quimioluminiscentes resueltas en el tiempo se combinan con un método de calibración multivariante de primer orden, para la resolución de una mezcla.

Se obtuvieron resultados satisfactorios en el análisis de mezclas binarias de ofloxacino-ciprofloxacino y ofloxacino-norfloxacino, empleando el método multivariante de primer orden PLS, demostrándose que la utilización de señales quimioluminiscentes resueltas en el tiempo es una manera viable de aumentar la información útil y disponible para un modelo de calibración.

En nuestro estudio, las diferencias en las señales quimioluminiscentes de las mezclas binarias investigadas fueron utilizadas, para resolver las mezclas binarias de norfloxacino-ofloxacino y ciprofloxacino-ofloxacino, empleando PLS. Este trabajo abre una nueva posibilidad de mejora de los métodos quimioluminiscentes, combinándolos con diversas herramientas quimiométricas.

### III.8. BIBLIOGRAFÍA

---

1. Martin A.R., in: Delgado J.N., Remers W.A. (Eds.), *Textbook of Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry*, ninth ed., J.B. Lippincott Company, (1991) 155.
2. Andriole V.T., *Las Quinolonas*, Ed. Academia Press, Limited London, (1989) 1-287.
3. Damaso, D., *Quimioterápicos II. Ácido Nalidíxico y análogos. Quinolonas. Fluoroquinolonas. Antibacterianos*. Ed. Marketing Pharm S.A. Madrid (1990) 135.
4. King, D.E., *Am. Fam. Physician.* 61 (2000) 2741.
5. Oliphant, C.M. *Am. Fam. Physician.* 65 (2002) 455.
6. O'Donell, J.A. Fluoroquinolones. *Infect. Dis. Clin. North. Am.* 14 (2000) 489.
7. Neuman, M., *Vademécum* Ed. Sigma, Roma (1994).
8. Vílchez J.L., Ballesteros O., Taoufik J., Sánchez-Palencia G., Navalón A., *Anal. Chim. Acta*, 444 (2001) 279.
9. Rahman N., Ahmad Y., Azmi S.N.H., *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 57 (2004) 359.
10. Sato K., Matsuura U., Inoue M., Une T., Osada Y., Ogawa H., Mitsuhashi M., *Antimicrob. Agents Chemother.*, 22 (1982) 548.
11. N. Ichihara, H. Tachizawa, M. Tsumura, T. Une, K. Sato, *Chemotherapy*, 32 (1984) 118.
12. Carlucci G., *J. Chromatogr.* 812 (1998) 343.
13. Kamberi M., Tsutsumi K., Kotegawa T., Nakamura K., Nakano K.S., *Clin. Chem.*, 44 (1998) 1251.
14. Maya M.T., Goncalves N.J., Silva N.B., Morais J.A., *J. Chromatogr. B*, 755 (2001) 305.
15. Wright D.H., Herman V.K., Konstantinides F.N., Rotschafer J.C., *J. Chromatogr. B*, 709 (2000) 97.
16. Cohen E., Maxwell R.J., Donoghue D.J., *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.*, 724 (1998) 137.
17. Yorke J.C., Froc P., *J. Chromatogr. A*, 882 (2000) 63.
18. Holtzapple C.K., Buckley S.A., Stanker L.H., *J. Chromatogr. B*, 754 (2001) 1.
19. Golet E.M., Alder A.C., Hartmann A., Ternes T.A., Giger W., *Anal. Chem.*, 73 (2001) 3632.

- 
20. Zotou, Miltiadou N., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 28 (2002) 559.
  21. El Walily A.F., Belal S.F., Barry R.S., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 14 (1996) 561.
  22. Nagaralli B.S., Seetharamappa J., Melwanki M.B., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 29 (2002) 859.
  23. Mostaza S., El-Sadek M., Alla E.A., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 27 (2002) 133.
  24. Rizk M., Belal F., Ibrahim F., Ahmed S., Sheribah Z.A., *J. AOAC Int.*, 84 (2001) 368.
  25. Navalon A., Ballesteros O., Blanc R., Vilchez J.L., *Talanta*, 52 (2002) 845.
  26. Hernandez M., Aguilar C., Borrull F., Calull M., *J. Chromatogr. B*, 772 (2002) 163.
  27. Schmitt-Kopplin Ph., Burhenne J., Freitag D., Spiteller M., Kettrup A., *J. Chromatogr. A*, 837 (1999) 253–265.
  28. Barron D., Jimenez Lozano E., Cano J., Barbosa J., *J. Chromatogr. B*, 759 (2001) 73.
  29. Snitkoff G.G., Grabe D.W., Holt R., Bailie G.R., *J. Immunoassay*, 19 (1998) 227.
  30. Garcia Campaña A.M., Baeyens W.R.G., Zhang X, Ales F. Gamiz L, *Ars Pharm*, 42 (2001) 81.
  31. Schuster G.B., *Acc Chem Res*, 12 (1979) 366.
  32. Kuroda, N., Nakashima, K. In *Modern Derivatization Methods for Separation Sciences*; Toyooka, T., Ed.; Wiley: New York, (1999) Chapter 4.
  33. Murillo Pulgarín J.A., García Bermejo L. F., Rubio Aranda J. A., *Anal. Chim. Acta*, 517 (2004) 111.
  34. *Food Chemical News*, C.R.C. Press: Washington DC, Vol 37 (1996) p 21.
  35. Liang Y.D., Li J.Z., Zhang Z.J., *Fenxi Huaxue*, 25 (1997) 1307-.
  36. Rao Y., Tong Y., Zhang X.R., Luo G.A., Baeyens W.R.G., *Anal. Lett.*, 33 (2000) 1117.
  37. Rao Y., Tong Y., Zhang X., Luo G., Baeyens W.R.G., *Anal Chim Acta*, 416 (2000) 227.
  38. Lian N., Zhai H.C., Sun C.Y., Chen S.L., Lu Y., Jin L.P., *Microchem J.*, 74 (2003) 223.
  39. Lian N., Sun C.Y., Zhao H.C., *Fenxi Kexue Xuebao*, 18 (2002) 111.

40. Yi L., Zhao H., Chen S., Jin L., Zheng D., Wu Z., *Talanta*, 61 (2003) 403-.
41. Sun H.W., Li L.Q., Chen, *Anal. Bioanal. Chem*, 384 (2005) 1314.
42. Liang Y.D., Song J.F., Yang X.F., *Anal. Chim. Acta*, 510 (2004) 21.
43. Wei H.Q., Liu E.B., Han S.Q., Xue B.C., *Fenxi Kexue Xuebao*, 21 (2005) 152.
44. He Z.K., Gao H., Yuan L.J., Luo Q.Y., Zeng Y.E., *Analyst*, 122 (1997) 1343.
45. Aly F.A., Al-Tamimi S.A., Alwarthan A.A., *Talanta*, 53 (2001) 885.
46. Suzuki K., Auki Y., Kido Y., Tsuji A., Ito K., Malda M., *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, 40 (1999) 23.
47. Hercules D.M., Lytle F.E., *J. Am. Chem. Soc.*, 88 (1966) 4745.
48. Gerardi R.D., Barnett N.W., Lewis S.W., *Anal. Chim. Acta*, 378 (1999) 1.
49. Li X., Ling L., He Z., Song G., Lu S., Yuan L., Zeng Y., *J. Microchem.*, 64 (2000) 9.
50. Pérez Bendito D., Silva M., Gómez Hens A., *Trends Anal. Chem.*, 8 (1989) 302.
51. Knight A.W., Greenway G.M., Chesmore E.D., *Anal. Proc.*, 32 (1995) 125.
52. Zhang Z.D., Baeyens W., Zhang W., Van der Weken G., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 14 (1996) 939.
53. Espinosa Mansilla A., Muñoz de la Peña A., González Gómez D., *The Chem. Educ.*, 10 (2005) 1.
54. Cuadros Rodríguez L., García Campaña A. M., Jiménez Linares C., Román Ceba M., *Anal. Lett.*, 26 (1993) 1243.
55. Andrew Clayton C., Hines J. W., Phillis D. Elkins, *Anal. Chem.*, 59 (1987) 2506.
56. Long G. L., Wineford J. D., *Anal. Chem.*, 55 (1983) 712.
57. Idowu O.R., Peggins J.O., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 35 (2004) 143.
58. Martinez A., Riu J., Busto O., Guasch J., Rius F.X., *Anal. Chim. Acta*, 406 (2000) 257.
59. González A.G., Herrador M.A., Suero A.G., *Talanta*, 48 (1999) 729.
60. Olivieri, A. C.; Goicoechea, H.C.; Inon, F. A., *Chemom. Intel. Lab. Syst.*, 73 (2004) 189.
61. Haaland D.M., Thomas E.V., *Anal. Chem.*, 60 (1998) 1193.
62. Haaland DM, Thomas EV, *Anal. Chem.*, 60 (1988) 1202.





**Capítulo IV**  
**DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE ÁCIDO FÓLICO**  
**Y METOTREXATO EN MUESTRAS BIOLÓGICAS**



#### IV.1. INTRODUCCIÓN

En el presente capítulo hemos trabajado con dos principios activos, ácido fólico, que actúa como precursor en la síntesis de DNA, y metotrexato, perteneciente al grupo de los antifolatos, con actividad quimioterápica en los tratamientos antineoplásicos. Las estructuras de estos compuestos se representan en la Figura IV.1.

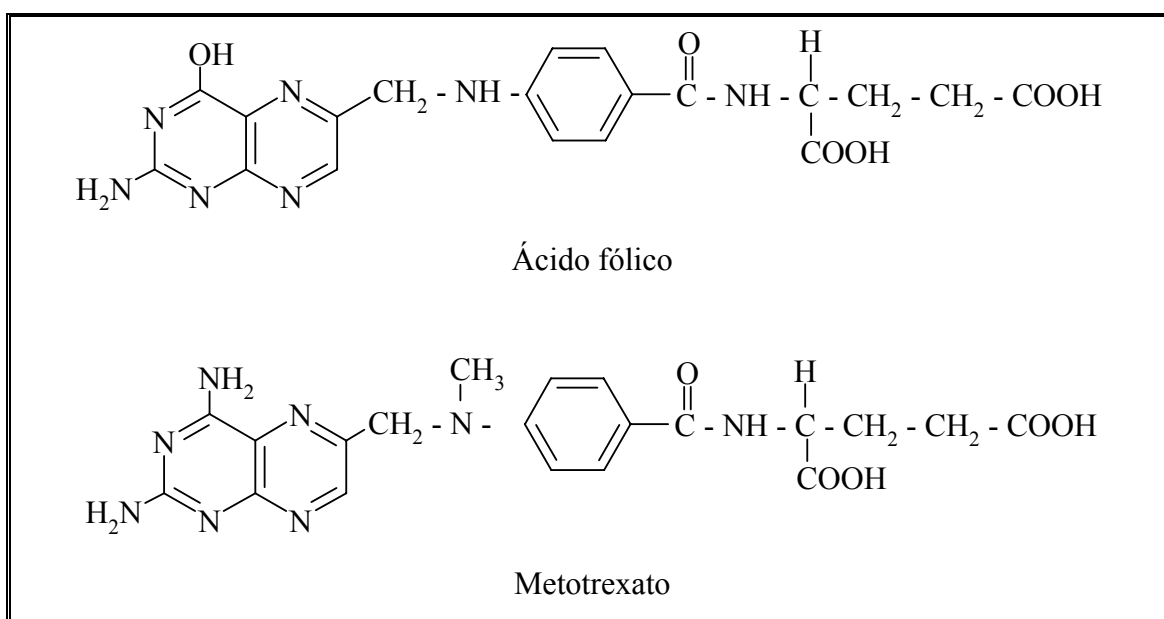


Figura IV.1. Estructura química de los diferentes compuestos.

El interés de la determinación conjunta de estos dos analitos se debe a que, recientes investigaciones, indican que el metotrexato inhibe la absorción de ácido fólico por el organismo y, por lo tanto, tratamientos prolongados con metotrexato pueden provocar la deficiencia de ácido fólico. Además, el ácido fólico previene efectos secundarios tóxicos del metotrexato, por lo que se prescriben juntos en algunos tratamientos como artritis reumatoide [1, 2].

El objetivo en este capítulo, es desarrollar un método multivariante para la determinación simultánea de ácido fólico y metotrexato. Ambos analitos se determinan indirectamente a partir de sus productos de oxidación con permanganato potásico,

mucho más fluorescentes. Registraremos la evolución cinética de la intensidad de fluorescencia, de los espectros de emisión y de las matrices de excitación-emisión, con el tiempo de oxidación, para aplicar métodos de calibración multivariante de primer, segundo y tercer orden. Empleando datos de cuatro vías, junto con PARAFAC, que nos proporciona la ventaja de segundo orden, es posible la cuantificación de estos dos analitos en presencia de componentes no calibrados presentes en la orina. Finalmente, se emplea algoritmo U-PLS/RTL para resolver esta mezcla en muestras de suero.

#### **IV.1.1. Características del Ácido Fólico**

El ácido fólico (ácido pteroilglutámico ó ácido 4-(2-amino-4-hidroxipteridin-6-il)metilamino-benzoil-L-glutámico), Figura IV.2, es una vitamina hidrosoluble del complejo B (vitamina B<sub>9</sub>) que ayuda a la formación de células saludables, ya que interviene en reacciones químicas vitales como la síntesis de nucleoproteínas (precuroras del ADN) [3]. Que sea vitamina “hidrosoluble” quiere decir que no permanece en el cuerpo durante mucho tiempo, por tanto, el hombre requiere de la dieta para cubrir sus necesidades diarias de esta vitamina, ya que los folatos son sintetizados solamente por las bacterias y las plantas [4].

El nombre “fólico” proviene de *folium*, hoja en latín, debido a que el ácido se descubrió por primera vez como componente de las hojas de espinaca [3].

Para ejercer su función en el interior de las células, el ácido fólico tiene que estar en su forma más reducida (FH<sub>4</sub>), por lo que debe existir un mecanismo de regeneración intracelular que se realiza mediante la acción de la enzima folato reductasa [5] con la intervención de NADPH como donador de hidrógeno [6]. La inhibición de esta reacción por el metotrexato u otros inhibidores de la dihidrofolatorreductasa impide la replicación celular, como posteriormente veremos en la Figura IV.4.

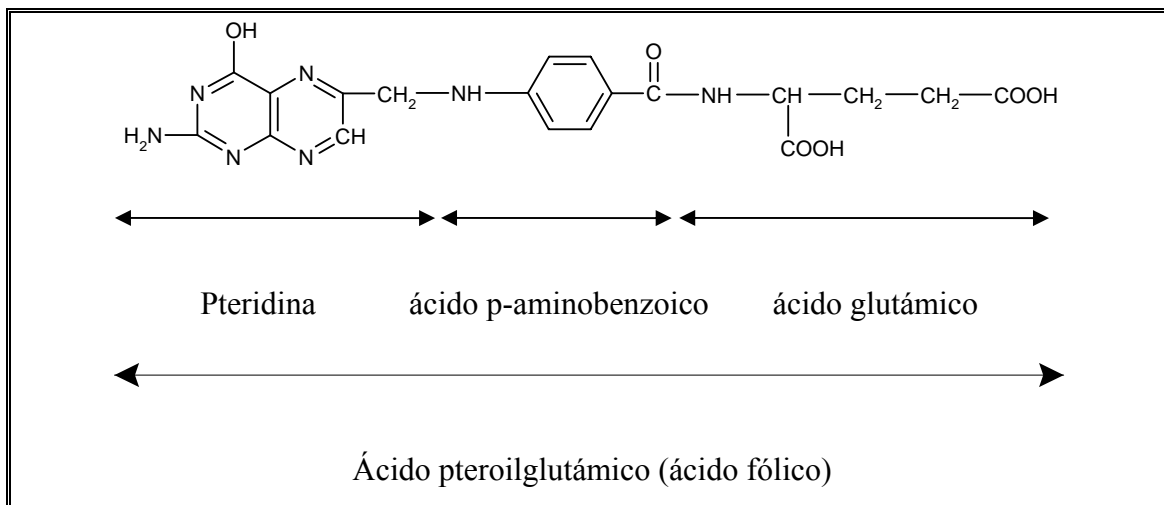


Figura IV.2. Estructura química del ácido pteroilglutámico.

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 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.

El trastorno más característico de una carencia de ácido fólico es precisamente la anemia macrocítica o megaloblástica, que produce alteraciones psiquiátricas, pérdida de memoria o demencia, entre otras alteraciones. Además de anemias, la carencia de ácido fólico durante el embarazo puede causar malformaciones neurológicas del feto, como la espina bífida; de ahí el énfasis que han puesto las autoridades sanitarias mundiales al control de los niveles de ácido fólico, particularmente en las embarazadas [3, 7, 8].

Hay condiciones especiales como las que se dan en una dieta deficitaria, alcoholismo, terapia con metotrexato y otros fármacos antifolato, que se han asociado con una deficiencia de ácido fólico y, en estos casos, pueden aparecer alteraciones digestivas, cutáneas, hematológicas, disminución de la fertilidad, abortos y algunas

alteraciones psíquicas (depresión, psicosis). El uso prolongado de fármacos, como los anticonvulsivos, los antipalúdicos y los esteroides, también predisponen a la deficiencia de folato [7].

Es muy beneficioso en la menopausia, ya que los folatos intervienen aumentando los niveles de estrógenos. Otras funciones atribuidas recientemente al ácido fólico son la regulación de determinados factores de riesgo cardiovascular, en especial la arteriosclerosis, y la prevención de determinados tipos de cáncer (tumores epiteliales, estómago y colon).

Hay dos formas diferentes del ácido fólico:

1.- *Forma sintética*: ésta se encuentra en preparados multivitamínicos, pan y cereales fortificados y prescripciones farmacéuticas utilizadas, 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, etc.

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

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 ligantes de folatos son las responsables de la retención de los folatos en los tejidos [9, 10].

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 mg/g) y el cerebro.

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 mg/día, en forma de metabolitos [11].

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 son rápidos, como en los tejidos hematopoyéticos, la mucosa gastrointestinal y el embrión en desarrollo.

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

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, siendo las columnas tipo C18 las más utilizadas. El sistema de detección más usado es el fotométrico [12-15] y, en menor medida, se utiliza la detección fluorimétrica [13-19] y la detección electroquímica [13, 21]. 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.

También se han propuesto diversas técnicas electroquímicas para la determinación de esta vitamina [22, 23], espectrofotometría de absorción molecular [24] y espectrofluorimetría [25, 26]. Estos métodos son utilizados principalmente para

determinar ácido fólico en preparados vitamínicos. Por último, técnicas tales como sistemas de análisis por inyección en flujo, FIA, [27] y la electroforesis capilar [28] se aplican también a la determinación del ácido fólico.

#### **IV.1.2. 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.

Se ha demostrado la eficacia del MTX 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 [29-31]. La actividad antineoplásica del MTX es más efectiva en dosis elevadas, siendo los primeros ensayos clínicos de este fármaco de hace aproximadamente 40 años.

##### ➤ *Propiedades físicas y químicas del MTX*

El MTX, Figura IV.3, antifolato típico, es un compuesto pteridínico 4-amino-sustituído de la forma:



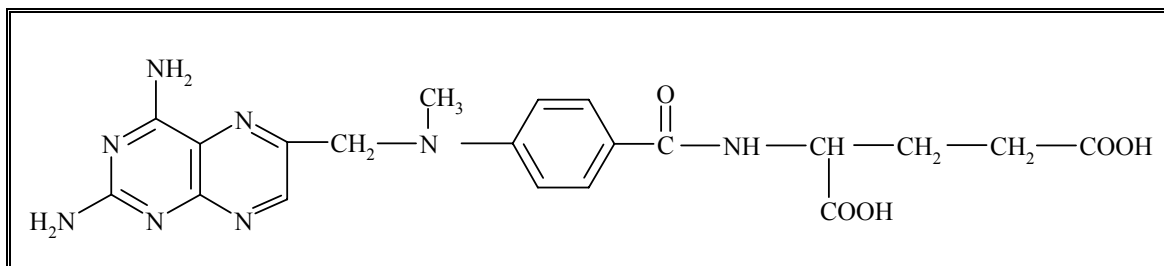


Figura IV.3. Estructura química del metotrexato.

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, cuando se encuentra en concentraciones superiores 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 se combina con la enzima objeto, DHFR, la síntesis de folato continua hasta que, aproximadamente el 95% de la actividad de la DHFR se ha inhibido. Por tanto, para que el MTX pueda actuar,

éste 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 produzca una proliferación grande de células, que es lo que ocurre en un cáncer.

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

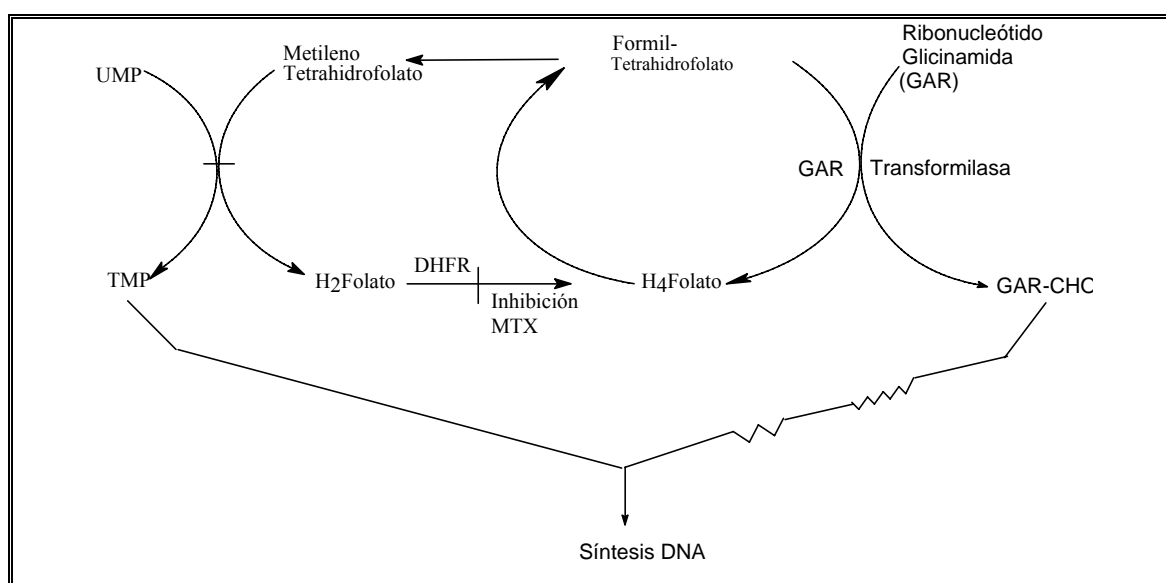


Figura IV.4. Mecanismo de acción del MTX.

El MTX actúa bloqueando dos reacciones: 1) Reducción del dihidrofolato (H<sub>2</sub>folato) a tetrahidrofolato (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 efectivas en ciertos tratamientos malignos. Pero estudios del MTX en farmacología celular, han determinado que el MTX debe administrarse en altas dosis (1.000 mg/m<sup>2</sup>) [32]. 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 [32-34]. 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 [33].

Los pacientes que reciben altas dosis de MTX deben estar muy vigilados por la toxicidad del tratamiento. La nefrotoxicidad reversible es uno de los graves problemas, seguido de mucositis gastrointestinal, náusea y vómitos y, esta toxicidad intrínseca inducida por MTX, puede reducirse si disminuimos la actividad antitumoral de la droga mediante uso de leucovorín (LV), que actúa como una estrategia de rescate en el tratamiento terapéutico [31, 33]. 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 porqué 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.

Hay varios métodos analíticos apropiados para la determinación de MTX. La técnica de espectrofotometría UV-visible se ha aplicado a la determinación de metotrexato, principalmente en preparaciones farmacéuticas [35, 36]. Estos procedimientos presentan intervalos de concentración cortos, comparados con otras técnicas, por ejemplo, las cromatográficas y, más concretamente, HPLC [37-39]. 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, se utiliza una columna C18. Este analito y sus metabolitos se determinan principalmente en fluidos biológicos. Dentro del campo de las técnicas electroanalíticas, se ha empleado también la voltametría de redisolución catódica, con electrodo de gota estática de Hg [40] y de redisolución anódica [41], para la determinación de MTX. Mediante electroforesis capilar y, en concreto, de zona, se ha determinado metotrexato y sus metabolitos [42-44] 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.

## Resultados y discusión



## IV.2. ESTUDIOS FLUORIMÉTRICOS PREVIOS

La fluorescencia nativa del ácido fólico (AF) y del metotrexato (MTX) es muy débil. Sin embargo, los productos formados como consecuencia del proceso de oxidación en presencia de permanganato potásico, son altamente fluorescentes [19, 45], por lo que se emplearán sus reacciones de oxidación para determinarlos. Comenzaremos este trabajo realizando un estudio sobre la influencia de los distintos parámetros químicos e instrumentales, en las cinéticas de oxidación y en las propiedades fluorescentes de los productos originados.

Se prepararon las disoluciones madre de ambos analitos en disolución acuosa, basificando el medio con NaOH hasta su completa solubilización, teniendo la precaución de mantenerlas protegidas de la luz, debido a que son fotosensibles. Estas disoluciones se almacenaron en el congelador, donde son estables al menos 3 meses. Las disoluciones de trabajo se prepararon diariamente, por dilución con agua ultrapura y se mantuvieron en la oscuridad.

En la Figura IV.5 se reúnen los espectros de excitación y emisión del ácido fólico (A), del metotrexato (B) y de sus respectivos productos de oxidación, obtenidos en presencia de  $\text{KMnO}_4$   $3.3 \times 10^{-5}$  M, a temperatura ambiente y pH 6. Bajo estas condiciones, la reacción finalizó a los 20 minutos y los máximos de excitación del producto de oxidación del ácido fólico se localizaron a 274 y 350 nm y, a 446 nm, el de emisión. En el caso del metotrexato, los máximos de excitación aparecen a 262 y 374 nm y el máximo de emisión a 463 nm.

De los estudios realizados, así como de los datos bibliográficos existentes [46], podemos concluir que la reacción de oxidación provoca la ruptura de las moléculas de ácido fólico y metotrexato, generando un derivado pteridínico por eliminación de parte de la cadena en C6 y originándose un grupo carboxílico.

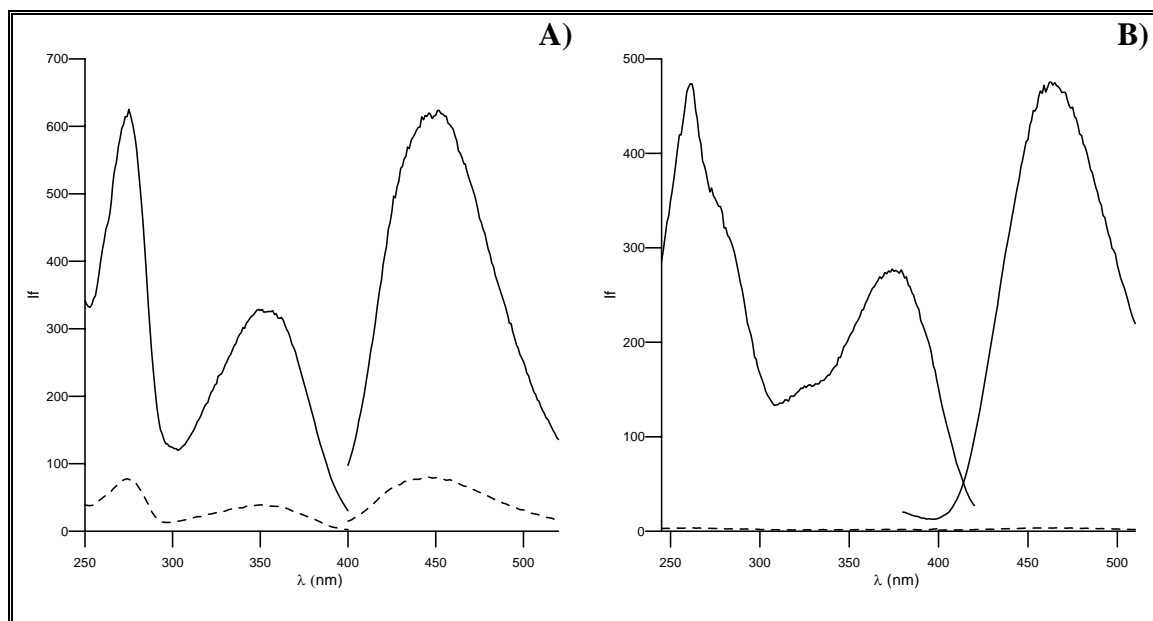


Figura IV.5. Espectros de excitación y emisión de fluorescencia de  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  de AF (----) y su producto de oxidación (—). Condiciones:  $\lambda_{exc} = 274 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 448 \text{ nm}$  (A) y de  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  de MTX (-----) y su producto de oxidación (—). Condiciones:  $\lambda_{exc} = 262 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 461 \text{ nm}$  (B). Voltaje del fotomultiplicador = 600 V; Rendijas de monocromadores ex/em = 5/5 nm.

Observamos que la intensidad de fluorescencia de los productos de oxidación es mucho mayor que la de los analitos de partida, por lo que llevaremos a cabo la determinación indirecta de ácido fólico y de metotrexato.

En primer lugar, estudiaremos la influencia de distintos parámetros químicos e instrumentales que influyen en estas reacciones de oxidación, con el objetivo final de que los productos de oxidación presenten el mayor rendimiento cuántico posible y de que las reacciones transcurran a una velocidad adecuada, para poder registrar la evolución, tanto de la intensidad de fluorescencia, como de los espectros de emisión y de las matrices de excitación-emisión, con el tiempo.



#### IV.2.1. *Optimización de las condiciones químicas y de los parámetros instrumentales*

Los estudios cinéticos de la oxidación del AF y del MTX, se llevaron a cabo mezclando manualmente los reactivos en la cubeta de medida del espectrofluorímetro y añadiendo el hidróxido sódico en último lugar. Se registraron las correspondientes curvas cinéticas de desarrollo de la fluorescencia, así como los espectros de fluorescencia de los productos de oxidación generados.

Las variables experimentales optimizadas fueron el pH, la concentración de tampón, la concentración de permanganato potásico y la temperatura.

##### ➤ *Influencia del pH*

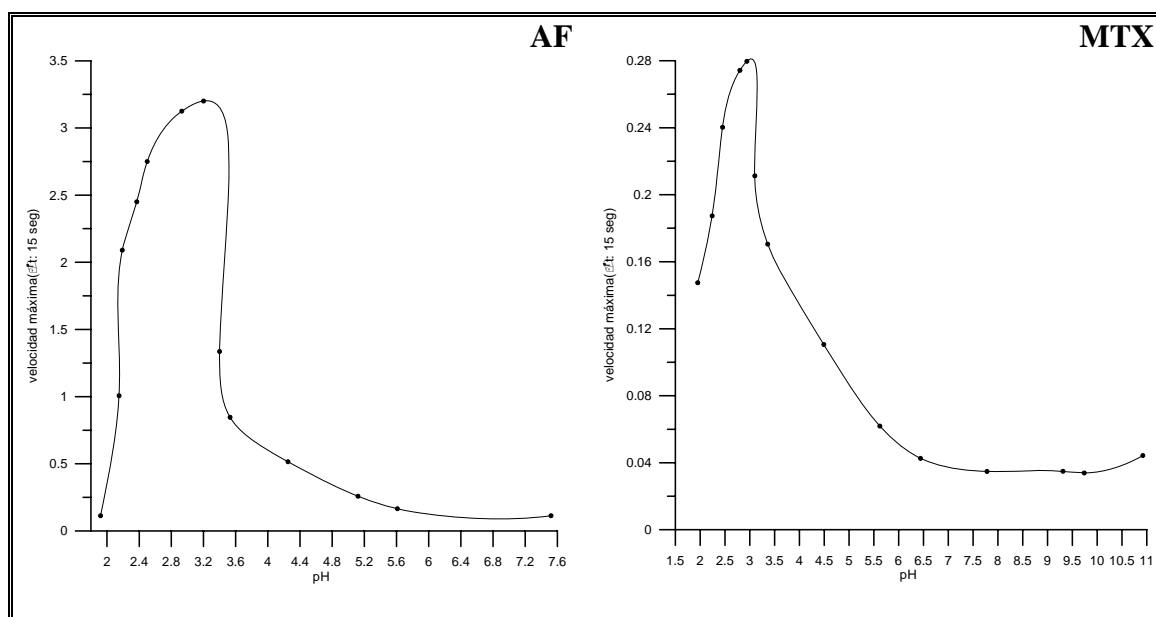
Para llevar a cabo este estudio, se preparan disoluciones de AF o de MTX en agua, conteniendo KCl 0.15 M y se van añadiendo gotas de HCl o NaOH hasta llegar al pH deseado. De cada disolución de pH adecuado, se toman 2 mL y se añaden a la cubeta de medida, siendo la concentración final de AF ó MTX  $1\mu\text{g mL}^{-1}$  y de KCl 0.1 M. En último lugar se añade 1 mL de  $\text{KMnO}_4$  de concentración  $10^{-4}$  M, siendo la concentración final  $3.3 \times 10^{-5}$  M.

La temperatura se mantuvo a 20 °C y las condiciones instrumentales que se fijaron fueron las siguientes:  $\lambda_{\text{exc}} = 274$  nm para el AF y 262 nm para el MTX,  $\lambda_{\text{em}} = 448$  nm para el AF y 461 nm para el MTX; 600 V; rendijas de monocromadores ex/em = 5/5 nm. En estas condiciones, se registraron las curvas cinéticas de cada disolución durante 5 minutos.

En la Tabla IV.1 se recogen los valores obtenidos al medir la velocidad de sendas reacciones de oxidación y, en la Figura IV.6, se representa la variación de la cinética de oxidación con el pH tanto para el AF como para el MTX.

Tabla IV.1. Velocidad de reacción en función del pH.

<b>Ácido fólico</b>		<b>Metotrexato</b>	
pH	Velocidad máxima ( $\Delta t = 15$ s)	pH	Velocidad máxima ( $\Delta t = 15$ s)
1.92	0.11	1.95	0.15
2.15	1.01	2.24	0.19
2.19	2.09	2.45	0.24
2.37	2.45	2.80	0.27
2.50	2.75	2.94	0.28
2.93	3.13	3.10	0.21
3.20	3.20	3.36	0.17
3.40	1.34	4.49	0.11
3.53	0.85	5.62	0.06
4.25	0.52	6.44	0.04
5.12	0.26	7.78	0.03
5.61	0.17	9.31	0.03
7.52	0.11	9.74	0.03
		10.92	0.04

Figura IV.6. Influencia del pH en las cinéticas de oxidación de  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  de AF y MTX con  $\text{KMnO}_4$   $3.3 \times 10^{-5}$  M.

Se observa como, en ambos casos, la velocidad máxima se alcanza a valores de pH próximos a 3, para disminuir rápidamente a medida que aumenta el pH. No obstante, además de una cinética adecuada, nos interesa obtener una buena diferenciación entre sendas curvas. En la Figura IV.7 podemos observar las curvas cinéticas de ambas reacciones a distintos pH.

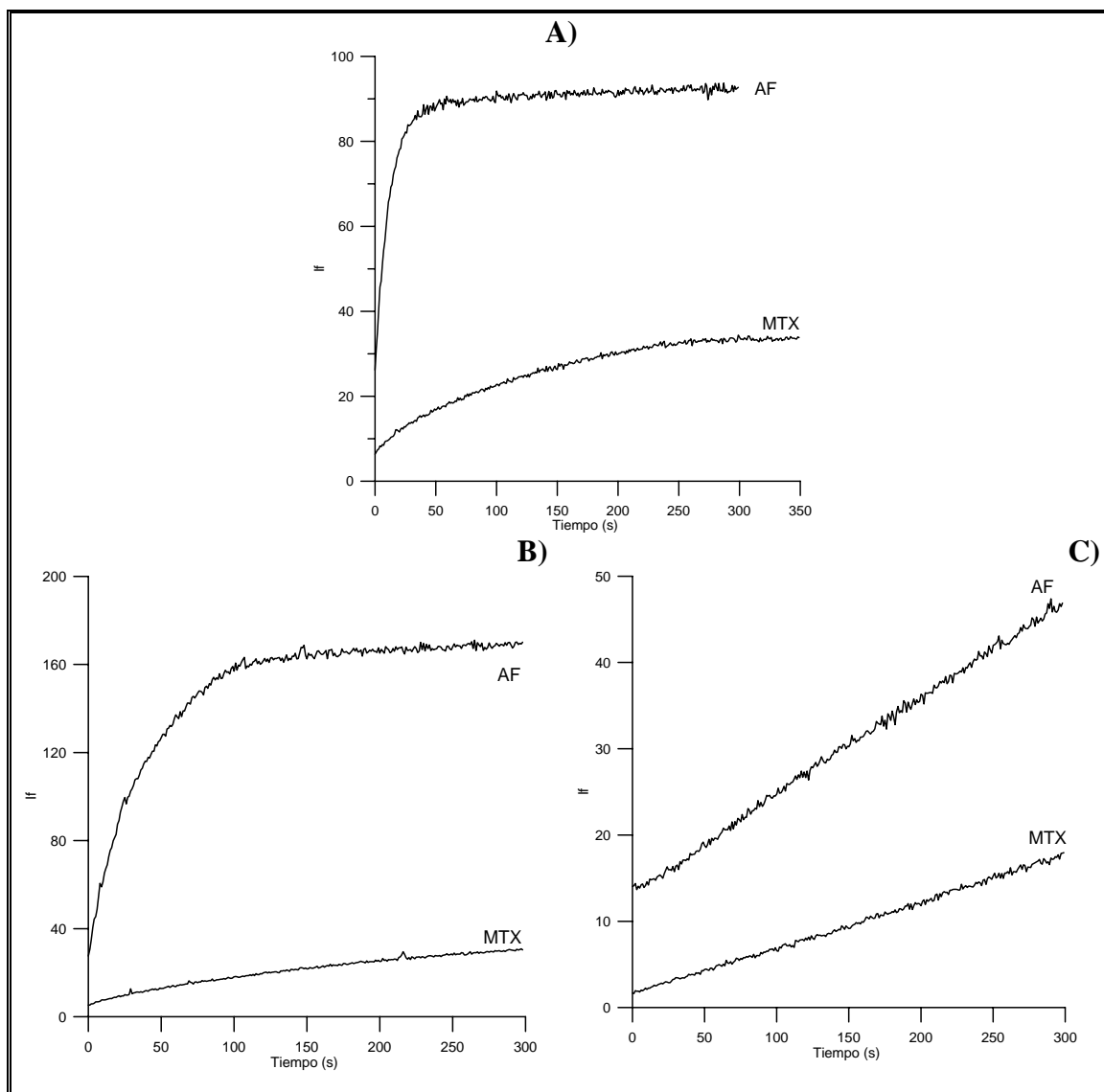


Figura IV.7. Curvas cinéticas de AF y MTX a distintos valores de pH. A) 2.9; B) 3.4 y C) 5.6.

Observamos que a pH 2.9 la oxidación del AF se completa en apenas 15 segundos, no siendo conveniente una cinética tan rápida para registrar la evolución de

las matrices de excitación-emisión con el tiempo, que es uno de los objetivos de este trabajo. A pH 3.4 la cinética es algo más lenta, completándose, en el caso del ácido fólico, en aproximadamente 100 segundos y, además, la intensidad de fluorescencia de los productos de oxidación aumenta. A pH 5.6, sin embargo, la cinética se hace excesivamente lenta. Por lo tanto, para sucesivos estudios, seleccionamos 3.4 como pH más adecuado.

Para conseguir esta acidez, emplearemos un tampón cloroacético/cloroacetato de concentración 0.5 M.

➤ *Influencia de la concentración de tampón*

Para estudiar la influencia de la concentración de tampón en ambas reacciones, se mantuvieron las mismas condiciones instrumentales que en el estudio anterior y una temperatura de 20 °C. Se prepararon disoluciones de ácido fólico y metotrexato, con concentraciones variables de tampón, a partir de las cuales se transfirieron 2 mL a la cubeta de medida y se añadió 1 mL de  $\text{KMnO}_4$   $10^{-4}$  M, siendo la concentración final  $3.3 \times 10^{-5}$  M.

En la Figura IV.8 se recogen las curvas cinéticas registradas para el MTX, pudiendo observar que la intensidad de fluorescencia del producto de oxidación del metotrexato disminuye al aumentar la concentración de tampón.

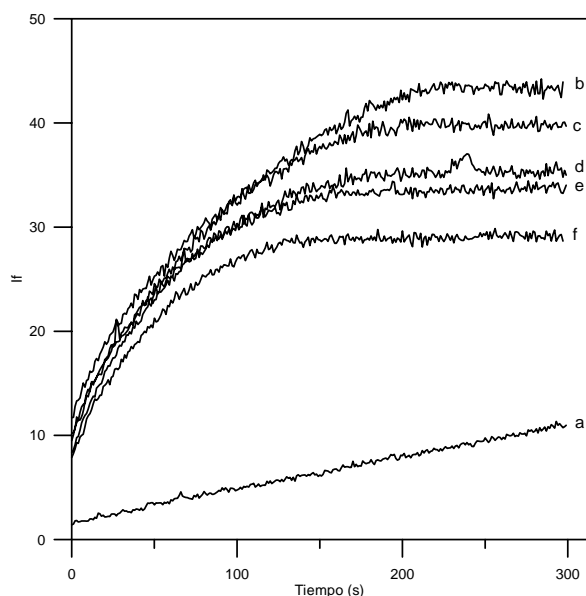


Figura IV.8. Curvas cinéticas de la oxidación de  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  de MTX con  $\text{KMnO}_4$   $3.3 \times 10^{-5}$  M, en función de la concentración de tampón: a) 0 M, b) 0.017 M, c) 0.05 M, d) 0.12 M, e) 0.17 M, f) 0.3 M.

En la Figura IV.9 se muestra la variación de la velocidad de oxidación de metotrexato, en función de la concentración de tampón, pudiéndose observar como la cinética se ve favorecida en presencia de tampón, permaneciendo prácticamente constante en todo el intervalo estudiado.

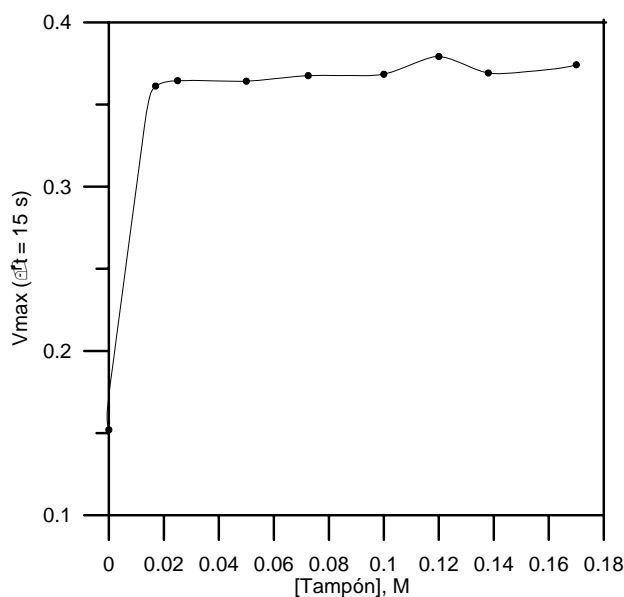


Figura IV.9. Influencia de la concentración de tampón en la oxidación de  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  de MTX con  $\text{KMnO}_4$   $3.3 \times 10^{-5}$  M.

Este mismo estudio se realizó con el ácido fólico y las correspondientes curvas cinéticas se recogen en la Figura IV.10. En la Figura IV.11 se representa la variación de la velocidad de oxidación del ácido fólico en función de la concentración de tampón.

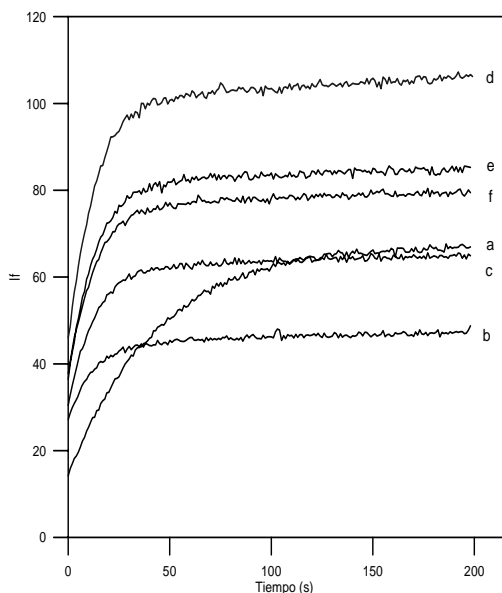


Figura IV.10. Curvas cinéticas de la oxidación de  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  AF con  $\text{KMnO}_4$   $3.3 \times 10^{-5}$  M, en función de la concentración de tampón: a) 0 M, b) 0.017 M, c) 0.033 M, d) 0.04 M, e) 0.05 M, f) 0.067 M.

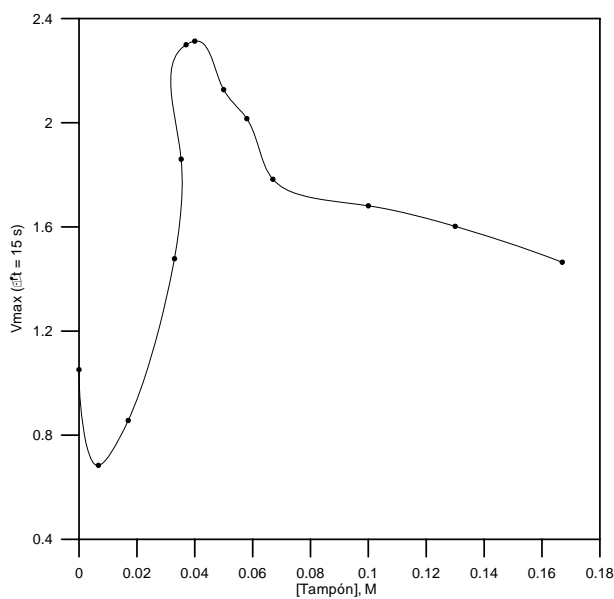


Figura IV.11. Influencia de la concentración de tampón en la cinética de oxidación de  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  de AF con  $\text{KMnO}_4$   $3.3 \times 10^{-5}$  M.

Observamos como aumentan tanto la velocidad de reacción como la fluorescencia del producto de oxidación con la concentración de tampón, hasta un valor aproximado de 0.04 M, para luego disminuir. Como la cinética de oxidación del ácido fólico es más afectado por la concentración de la disolución reguladora, para posteriores experiencias, elegimos como concentración más adecuada la de 0.04 M.

Al realizar este estudio, hemos observado que, tanto la velocidad de reacción como la intensidad de fluorescencia del producto de oxidación del ácido fólico, disminuyen cuanto más tiempo esté en contacto el tampón con el ácido fólico. Por este motivo, en ensayos posteriores, añadiremos el tampón directamente en la cubeta de medida, justo antes de añadir el  $\text{KMnO}_4$ .

➤ *Influencia de la concentración de permanganato potásico*

Una vez optimizados el pH y la concentración de tampón, estudiamos la influencia del permanganato potásico, tanto en la velocidad de reacción como en la intensidad de fluorescencia de los productos de oxidación.

Se registraron las curvas cinéticas, Figura IV.12, manteniendo una temperatura de 20 °C y las condiciones instrumentales explicadas previamente. Los reactivos se añadieron directamente en la cubeta de medida, conteniendo en un volumen final de 3 mL: 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de AF o MTX, 0.04 M de tampón cloroacético/cloroacetato y  $\text{KMnO}_4$  de concentración variable.

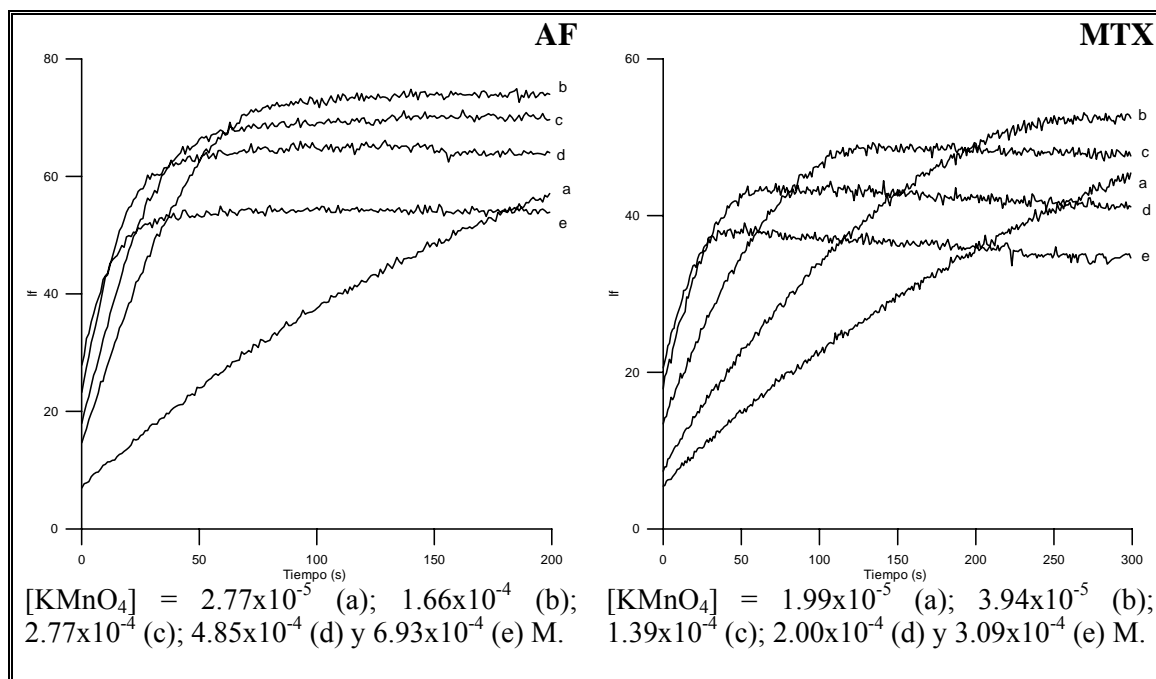


Figura IV.12. Curvas cinéticas de la oxidación de  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  de AF y MTX en función de la concentración de  $KMnO_4$ .

En ambas reacciones, inicialmente aumenta la fluorescencia del producto de oxidación al aumentar la concentración de permanganato potásico, hasta llegar a un determinado valor, a partir del cual comienza a disminuir. Además, podemos observar como se completa la reacción en menor tiempo al aumentar la concentración de permanganato, en apenas 20 segundos, para los mayores valores de concentración de  $KMnO_4$  ensayados.

Realizamos más ensayos, en los que registramos las curvas cinéticas de disoluciones que contenían ácido fólico y metotrexato, variando la concentración de permanganato. El equipo empleado nos permite registrar simultáneamente hasta seis curvas cinéticas, fijando los monocromadores de emisión y excitación a distintas longitudes de onda. Así, registraremos simultáneamente dos curvas cinéticas de una mezcla de  $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$  de ácido fólico y  $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$  de metotrexato, fijando los monocromadores de excitación y emisión a 274-448 nm (la señal se deberá



fundamentalmente al producto de oxidación del AF) y 262-461 nm (la señal se deberá fundamentalmente al producto de oxidación del MTX), respectivamente.

La temperatura se mantuvo a 20 °C, el voltaje del fotomultiplicador a 600 V y las rendijas de monocromadores ex/em en 5/5 nm. Se registraron las curvas cinéticas durante 5 minutos, Figura IV.13.

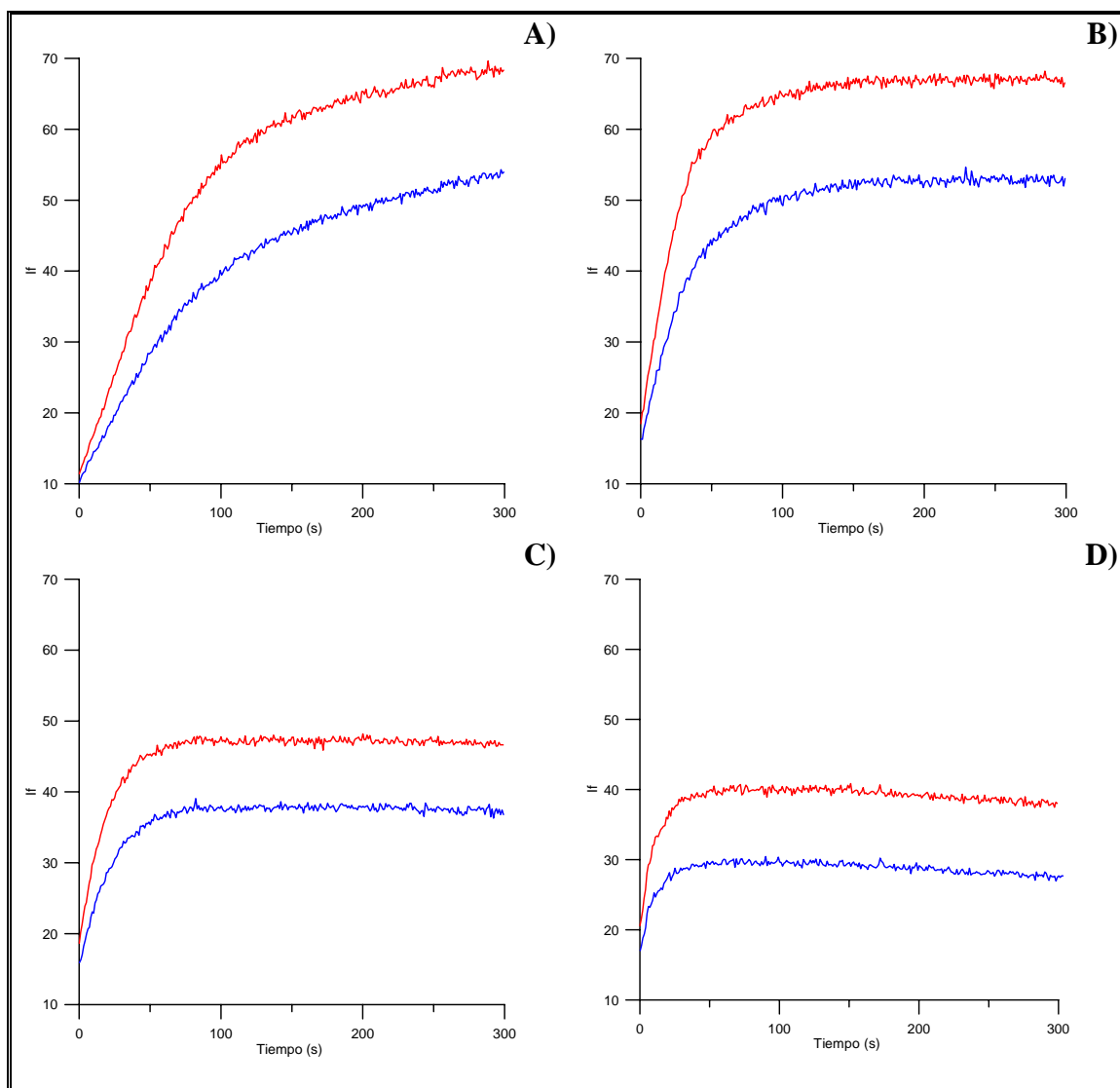


Figura IV.13. Influencia de la concentración de  $KMnO_4$  en la oxidación de una mezcla de  $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$  de AF y  $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$  de MTX registradas a  $\lambda_{exc/em} = 274/448 \text{ nm}$  (—) y  $\lambda_{exc/em} = 262/461 \text{ nm}$  (—).  $[KMnO_4] = 1.4 \times 10^{-5}$  (A);  $1.1 \times 10^{-4}$  (B);  $2.8 \times 10^{-4}$  (C) y  $5.5 \times 10^{-4}$  (D) M.

En la figura anterior observamos, de nuevo, como la reacción se completa en menor tiempo al aumentar la concentración de agente oxidante. Si representamos la intensidad de fluorescencia a los 300 segundos, Figura IV.14, observamos que, para los dos productos de oxidación formados, ésta disminuye al aumentar la concentración de  $\text{KMnO}_4$ .

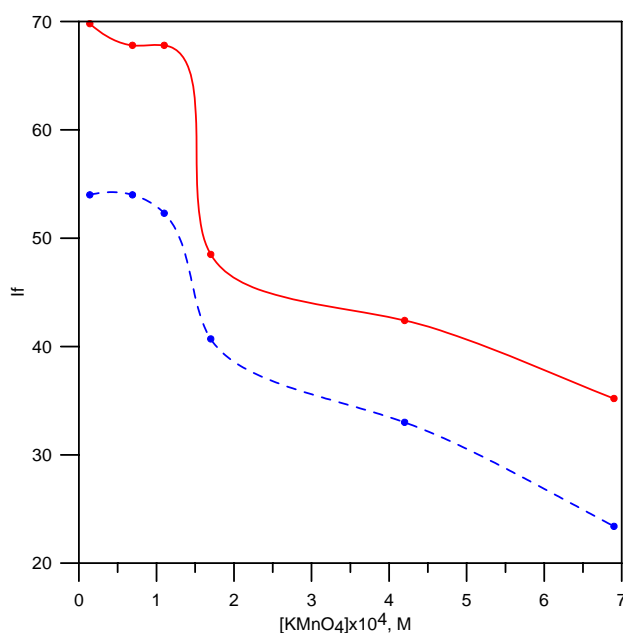


Figura IV.14. Influencia de  $[\text{KMnO}_4]$  en la fluorescencia de los productos de oxidación del AF,  $\lambda_{exc/em} = 274/448 \text{ nm}$  (—) y MTX,  $\lambda_{exc/em} = 262/461 \text{ nm}$  (- - -).

Seleccionamos una concentración óptima de  $\text{KMnO}_4$  de  $1.4 \times 10^{-5} \text{ M}$ , debido a que la intensidad de fluorescencia de los productos de oxidación es la mayor y, además, la reacción es lo suficientemente lenta como para registrar las matrices de excitación-emisión con el tiempo.

Una vez optimizadas las variables químicas, antes de estudiar la influencia de la temperatura, se registraron de nuevo los espectros de fluorescencia de los productos de oxidación, Figura IV.15, debido a que se producen ligeros desplazamientos en los máximos de excitación y emisión con el pH.

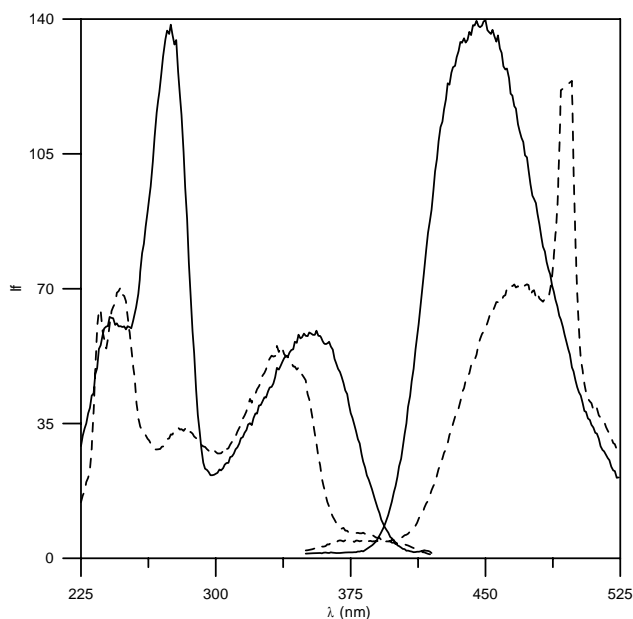


Figura IV.15. Espectros de fluorescencia de los productos de oxidación de  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  de AF (—) y de  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  de MTX (-----) en presencia de  $\text{KMnO}_4$   $1.4 \times 10^{-5}$  M.

Bajo estas condiciones, los máximos de excitación del producto de oxidación del AF se localizaron a 274 y 350 nm y a 446 nm el de emisión. En el caso del MTX, los máximos de excitación aparecen a 247 y 336 nm y el máximo de emisión a 469 nm.

En la gráfica anterior podemos observar el alto grado de solapamiento de los espectros de fluorescencia de las especies a determinar.

➤ *Influencia de la temperatura*

Para llevar a cabo este estudio, se estudiaron las cinéticas de cada analito por separado y de la mezcla, registrando las curvas cinéticas entre los 15 y 40 °C.

Las condiciones instrumentales que se fijaron fueron las siguientes:  $\lambda_{\text{exc}} = 274$  nm para el AF y 247 nm para el MTX;  $\lambda_{\text{em}} = 446$  nm para el AF y 469 nm para el MTX;

600 V; rendijas de monocromadores ex/em en 5/5 nm. Al igual que en los ensayos anteriores, las disoluciones se prepararon directamente en la cubeta de medida.

En la Figura IV.16 se representa la variación de la velocidad de oxidación de ambos analitos en función de la temperatura.

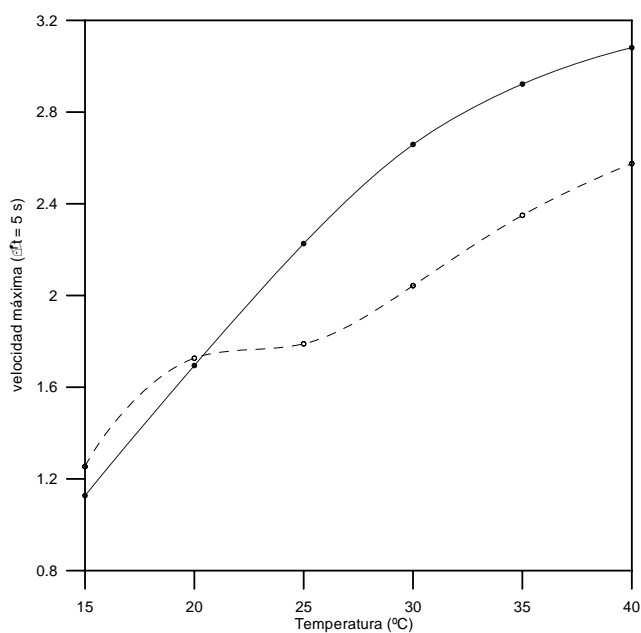


Figura IV.16. Influencia de la temperatura en la cinética de oxidación de  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  de AF (—) y de  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  de MTX (-----).

Como cabe esperar, las velocidades de reacción aumentan con la temperatura. Al estudiar la oxidación de la mezcla y registrar simultáneamente las dos curvas cinéticas, observamos esta misma tendencia.

En la Figura IV.17 se representan las curvas cinéticas de  $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$  de AF y  $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$  de MTX, a distintas temperaturas, 15 y 40 °C. Podemos observar, por una parte, que la reacción finaliza en menor tiempo cuanto mayor es la temperatura y, por otra, que la temperatura suele afectar a la emisión de fluorescencia haciendo que disminuya pues, a mayor temperatura, existe mayor probabilidad de desactivación del

estado excitado por mecanismos de desactivación no radiante. Teniendo en cuenta ambos efectos, seleccionamos 20 °C como valor óptimo de compromiso.

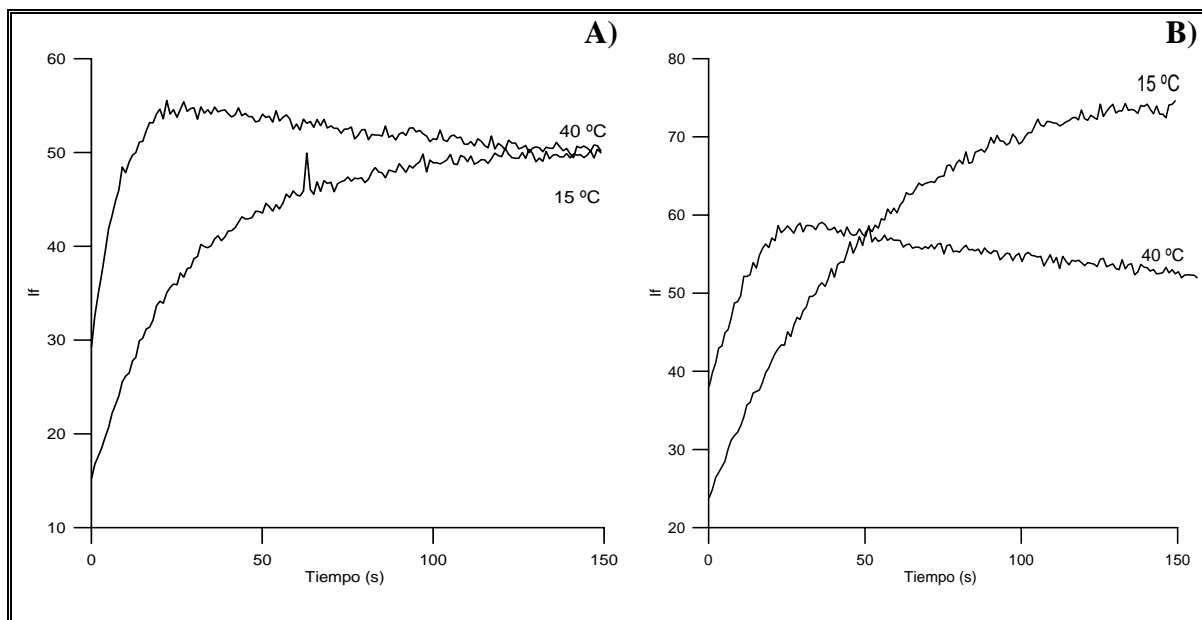


Figura IV.17. Curvas cinéticas registradas a  $\lambda_{exc/em} = 274/446 \text{ nm}$  (A) y  $\lambda_{exc/em} = 247/469 \text{ nm}$  (B).

➤ *Relación señal/ruido*

Finalmente, se estudió la influencia del voltaje del fotomultiplicador y de la apertura de las rendijas de los monocromadores en la relación *señal/ruido*, para distintas concentraciones de los analitos.

Debido a que, en primer lugar, abordaremos la resolución de esta mezcla empleando datos de primer orden, como son las curvas cinéticas de formación de los productos de oxidación de ambos analitos, tomaremos como señal la velocidad máxima de reacción, por lo que optimizaremos la relación *velocidad máxima/ruido instrumental* ( $V/R$ ).

Se registraron las curvas cinéticas de la oxidación del AF y del MTX, seleccionando unas longitudes de onda de compromiso y fijando los monocromadores

de excitación y emisión en 350 y 460 nm, respectivamente, Figura IV.18. La velocidad máxima se calculó durante un intervalo de tiempo de 50 segundos.

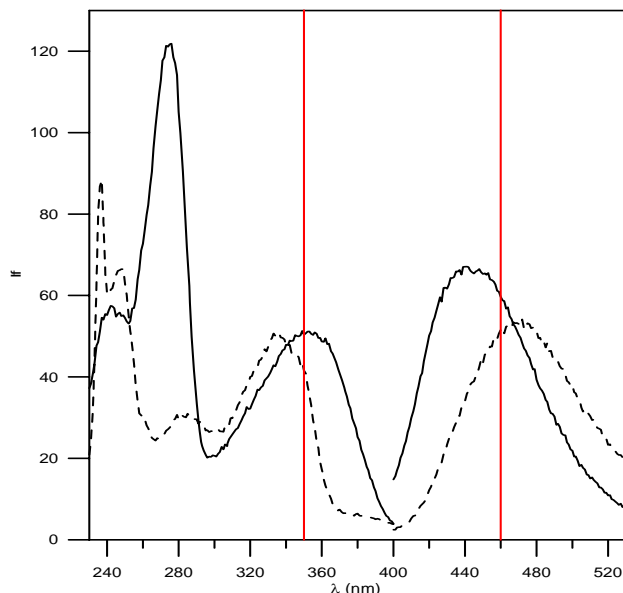


Figura IV.18. Espectros de fluorescencia de los productos de oxidación de  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  de AF (—) y de  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  de MTX (-----) bajo las condiciones experimentales óptimas.

Para calcular el ruido del equipo se operó del siguiente modo:

- 1) Se registran dos réplicas de la curva cinética y se calcula la curva media con el software del Varian, Cary Eclipse.
- 2) Se filtra esa curva media empleando un algoritmo de Savitsky-Golay (opción del programa Cary Eclipse).
- 3) Se resta la curva media sin filtrar de la filtrada y se calcula la desviación estándar del resultado obtenido anteriormente, para determinar el ruido del fluorímetro asociado a cada medida.

Así, registramos las curvas cinéticas de disoluciones de MTX que contienen  $0.2$  y  $1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente, modificando el voltaje del fotomultiplicador, Figura IV.19 y Figura IV.20. Los monocromadores se fijaron en 350 y 460 nm y las rendijas de ex/em en 5/5 nm.

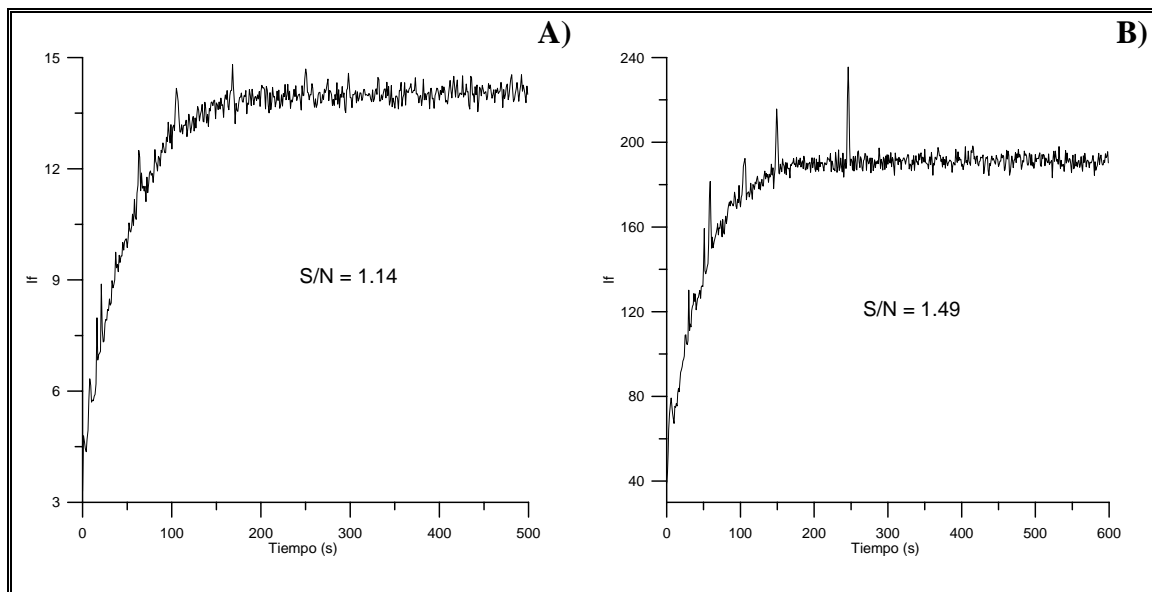


Figura IV.19. Curvas cinéticas de la oxidación de  $0.2 \mu\text{g mL}^{-1}$  de MTX. Voltaje del fotomultiplicador = 600 V, A) y 800 V, B).

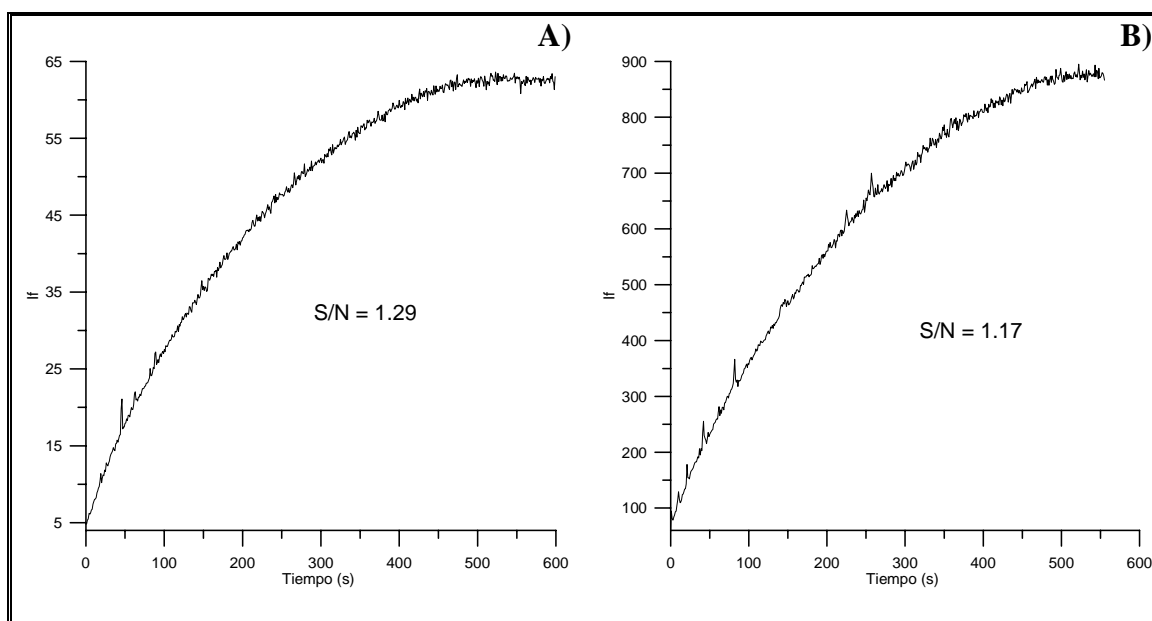


Figura IV.20. Curvas cinéticas de la oxidación de  $1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$  de MTX. Voltaje del fotomultiplicador = 600 V, A) y 800 V, B).

Observamos que, para la menor concentración de MTX, obtenemos la mayor relación S/N empleando el mayor voltaje del fotomultiplicador, mientras que si aumentamos la concentración, esta relación empeora a 800 V. Además, al registrar la curva cinética para el AF, cuyo producto de oxidación es más fluorescente, observamos que se satura el detector, por lo que no emplearemos un voltaje mayor a 600 V.

También se registraron las curvas cinéticas de dos disoluciones que contenían ambos analitos (*disolución 1*: 0.1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  AF y 0.1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de MTX; *disolución 2*: 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  AF y 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de MTX), empleando un voltaje de 600 V y modificando la rendija de los monocromadores ex/em: 5/5, 5/10 y 10/10 nm. En este último caso, 10ex/10em, se satura el detector al registrar la curva cinética de la *disolución 2*. La mayor relación S/N se obtuvo con ex/em 5/10. Optimizada la rendija de los monocromadores, de nuevo se modificó el potencial de la lámpara (sin superar los 600 V) y se obtuvo la mayor relación S/N con 550 V.

En la Tabla IV.2 se recogen las condiciones químicas e instrumentales óptimas.

Tabla IV.2. Condiciones experimentales óptimas.

Condiciones óptimas en la cubeta de medida	Condiciones instrumentales óptimas
[MTX] = variable	$\lambda_{\text{ex}} = 350 \text{ nm}$
[Fólico] = variable	$\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$
pH = 3.4	Rendijas ex/em = 5/10 nm
[ácido cloacético/cloroacetato sódico] = 0.04 M	Voltaje = 550 V
[KMnO <sub>4</sub> ] = $1.4 \times 10^{-5}$ M	Temperatura = 20 °C

#### IV.2.2. Estudio de la linealidad

Empleando las condiciones recogidas en la Tabla IV.2, se estudió la linealidad entre la concentración de ambos analitos y las cinéticas de oxidación, Figura IV.21, así como las intensidades de fluorescencia de los productos de oxidación al finalizar la reacción, Figura IV.22.



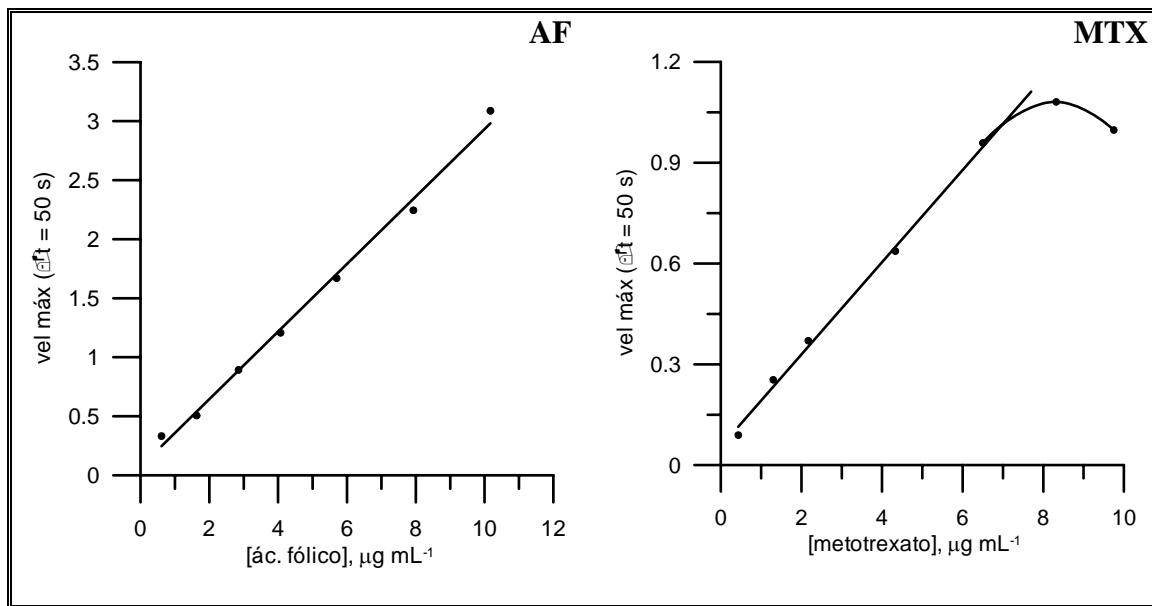


Figura IV.21. Influencia de la concentración de AF y MTX en sus cinéticas de oxidación.  $\lambda_{ex/em} = 350/460 \text{ nm}$ ;  $[\text{KMnO}_4] = 1.4 \times 10^{-4} \text{ M}$ ;  $\text{pH} = 3.4$ .

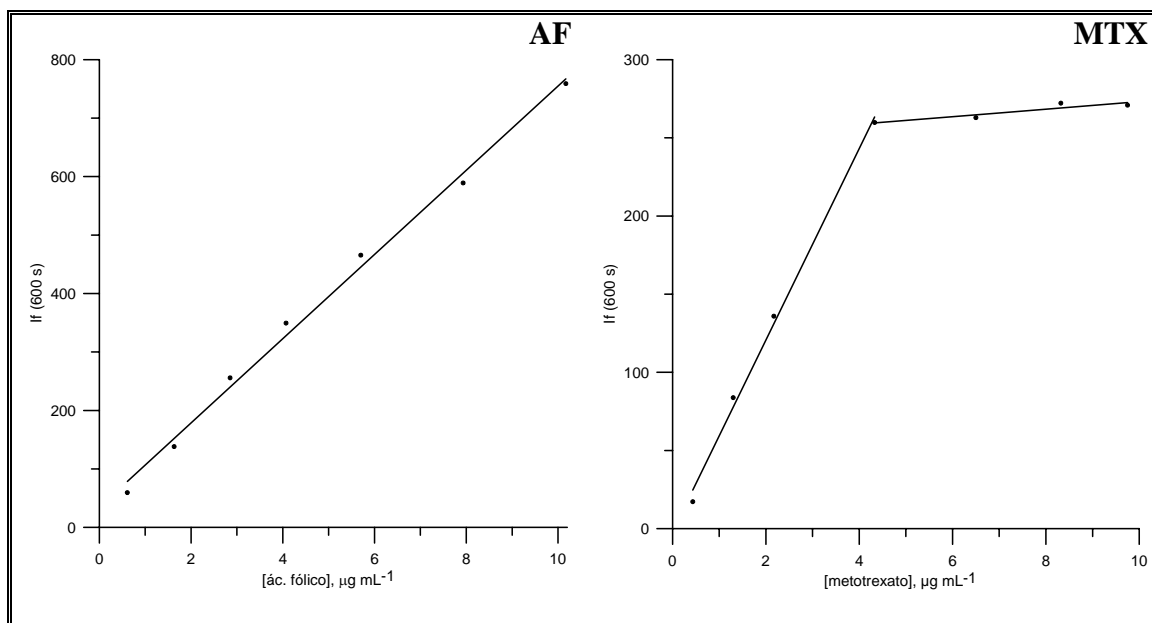


Figura IV.22. Influencia de la concentración de AF y MTX en la fluorescencia de sus productos de oxidación a los 10 minutos de reacción.  $\lambda_{ex/em} = 350/460 \text{ nm}$ ;  $[\text{KMnO}_4] = 1.4 \times 10^{-4} \text{ M}$ ;  $\text{pH} = 3.4$ .

Observando la Figura IV.21, concluimos que la velocidad de oxidación del metotrexato es lineal con la concentración hasta un valor aproximado de  $6.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ , mientras que la velocidad del ácido fólico lo es en todo el intervalo estudiado.

En la Figura IV.22, observamos que, la fluorescencia del producto de oxidación del ácido fólico, aumenta con la concentración en todo el intervalo estudiado. En el caso del producto de oxidación del metotrexato, aumenta la fluorescencia con la concentración hasta un valor aproximado de  $4.3 \mu\text{g mL}^{-1}$ , a partir del cual se mantiene constante, debido a que el  $\text{KMnO}_4$  actúa como reactivo limitante.

Optimizadas todas las variables experimentales, aplicaremos datos de primer, segundo y tercer orden, para intentar resolver esta mezcla tan compleja y comprobaremos como, tan solo al emplear datos de tercer orden (4 vías), es posible la resolución en matrices biológicas.

### IV.3. DETERMINACIÓN DE AF Y MTX EMPLEANDO DATOS DE PRIMER ORDEN

En este apartado intentaremos resolver la mezcla binaria de ácido fólico y metotrexato empleando el método de calibración multivariante de primer orden PLS-1. Como señal analítica utilizaremos las curvas cinéticas correspondientes a las reacciones de oxidación del ácido fólico y del metotrexato en presencia de  $\text{KMnO}_4$ . Utilizaremos las condiciones instrumentales y químicas ya seleccionadas previamente y recogidas en la Tabla IV.2.

Para estudiar la aditividad de las señales, se preparan dos disoluciones independientes de AF y de MTX conteniendo cada una de ellas 1 ppm de analito y otra disolución que tenía ambos analitos en la misma concentración. Se registraron las curvas cinéticas, Figura IV.23, donde podemos comprobar que, una vez que ambas reacciones finalizan, la suma de las intensidades de fluorescencia de cada analito es prácticamente la misma que la de la disolución de la mezcla.

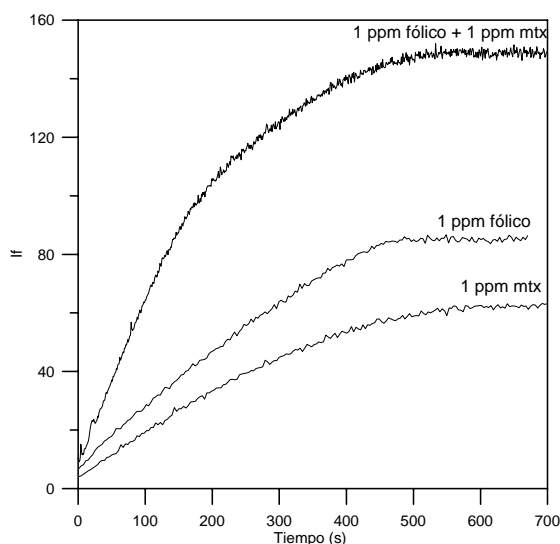


Figura IV.23. Curvas cinéticas registradas a  $\lambda_{ex/em} = 350/460 \text{ nm}$ ;  $[\text{KMnO}_4] = 1.4 \times 10^{-4} \text{ M}$ ;  $\text{pH} = 3.4$ .

➤ *Diseño de la matriz de calibración*

El diseño de la matriz de calibración siempre es un paso fundamental en todos los métodos de calibración multivariante, para, posteriormente, obtener una matriz de calibrado con una adecuada capacidad de resolución. Es importante evitar la colinealidad, emplear un número suficientemente bajo de patrones y abarcar un amplio rango de concentraciones, que incluyan las relaciones entre las concentraciones de los componentes en las muestras de interés. En este caso utilizaremos una combinación de dos diseños. Por un lado un diseño *factorial de tres niveles* y por otro *un diseño central compuesto*.

En la Figura IV.24 podemos ver como se distribuyen los patrones de la matriz de calibración, en función del diseño utilizado. En este caso, al utilizar una combinación de los dos diseños, Figura IV.24.C, resulta un conjunto de calibración constituido por 13 muestras patrón de los dos componentes, en concentraciones comprendidas entre 0 y 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , cuya composición se recoge en la Tabla IV.3.

Cada uno de estos patrones se preparó directamente en la cubeta de medida, añadiendo en cada caso, la cantidad adecuada de los analitos, 1 mL de disolución reguladora ácido cloroacético/cloroacetato sódico 0.12 M, pH 3.4, y en último lugar 1 mL de disolución de  $\text{KMnO}_4$   $4.2 \times 10^{-5}$  M. El volumen final se ajusta hasta 3.0 mL por adición de agua ultrapura.

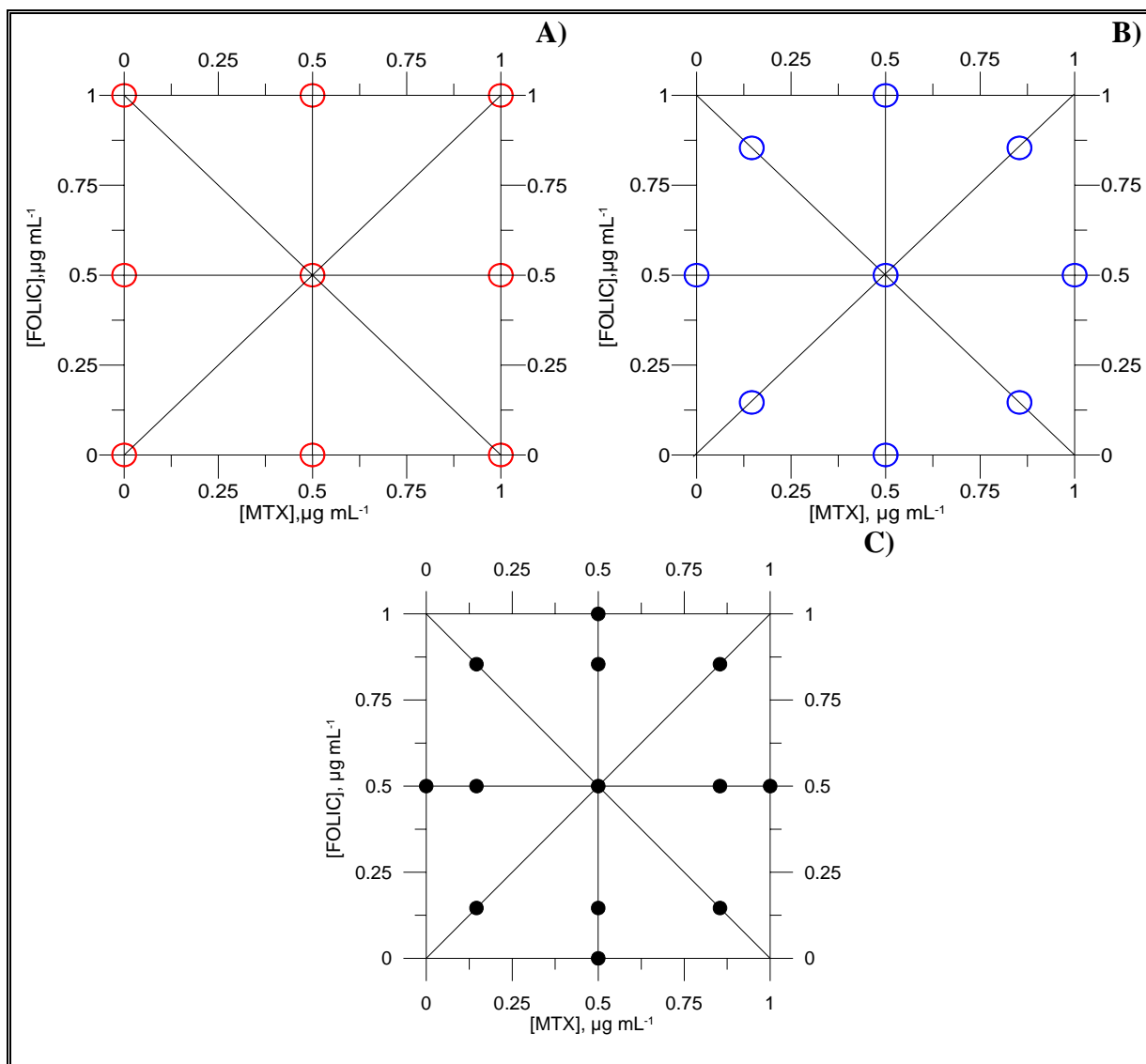


Figura IV.24. Representación de los diseños de la matriz de calibración: A) diseño factorial con 3 niveles por factor; B) diseño central compuesto; C) combinación de los diseños anteriores.

Tabla IV.3. Composición de la matriz de calibración.

<b>PATRON</b>	<b>[AF], <math>\mu\text{g mL}^{-1}</math></b>	<b>[MTX], <math>\mu\text{g mL}^{-1}</math></b>
P1	0.146	0.145
P2	0.146	0.491
P3	0.146	0.847
P4	0.500	0.145
P5	0.500	0.491
P6	0.500	0.847
P7	0.854	0.145
P8	0.854	0.491
P9	0.854	0.847
P10	0.500	0.000
P11	0.500	0.982
P12	0.000	0.491
P13	1.000	0.491

Todas las muestras se prepararon por duplicado y para cada una de ellas, se registró la correspondiente curva cinética durante 600 segundos. Como señal analítica, en todos los casos utilizamos la curva cinética media obtenida para cada patrón. En la Figura IV.25 se observan las curvas cinéticas medias de todos los patrones de calibración.

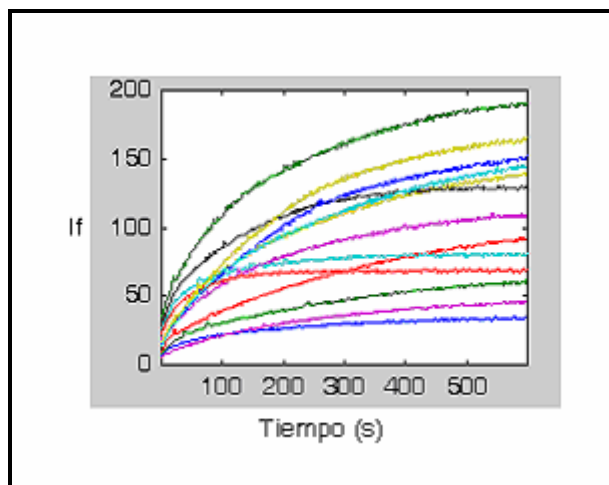


Figura IV.25. Curvas cinéticas medias, correspondientes a las muestras que componen la matriz de calibración.

Para optimizar el modelo de calibración, se hizo uso del programa MVC1, que nos permite aplicar, entre otros, el método de calibración multivariante de primer orden PLS-1, con el que pretendemos resolver esta mezcla.

Previamente, en todos los casos, es necesario transformar los datos obtenidos con el espectrofluorímetro Varian, empleado en este estudio, al formato ASCII, que es el necesario para trabajar con MVC1. Para ello empleamos el programa INTERFACE, cuya pantalla principal es la que aparece en la Figura IV.26, desarrollado en el Departamento de Química Analítica de la Universidad de Extremadura y programado bajo el entorno Matlab 5.3, donde solo es necesario indicar el nombre del fichero con la correspondiente extensión, y el nombre del fichero de salida con la extensión *.txt*.

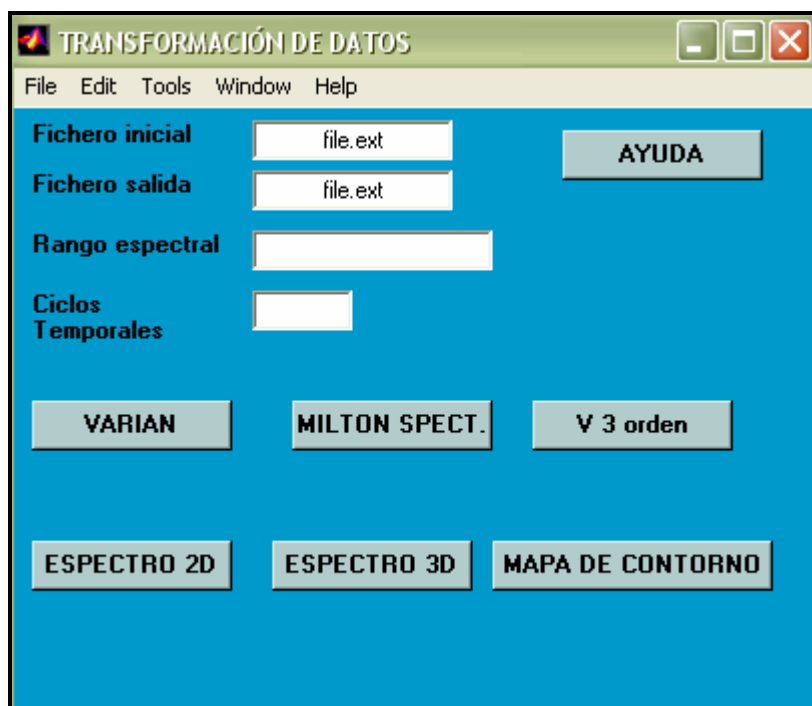


Figura IV.26. Pantalla principal del programa INTERFACE.

La optimización del intervalo de tiempo utilizado para realizar la etapa de calibración se llevó a cabo realizando la validación cruzada modificando el intervalo de los sensores (tiempos) y analizando el coeficiente de determinación,  $R^2$ , y el valor del parámetro PRESS (suma de los cuadrados de los errores residuales) en todos los casos. Se decidió utilizar todo el intervalo de tiempos de 0 a 600 segundos.

Para la optimización del número de factores, se ha utilizado el criterio de Haaland y Thomas [47, 48], encontrándose para ambos analitos un número de factores óptimos de dos.

Los parámetros estadísticos correspondientes a cada uno de los analitos se recogen en la Tabla IV.4, obteniéndose valores de  $R^2$  muy similares en ambos casos.



Tabla IV.4. Parámetros estadísticos del modelo PLS-1 para la resolución de la mezcla de AF y MTX.

	Factores	PRESS	R <sup>2</sup>
<b>Ácido Fólico</b>	2	0.0359	0.9634
<b>Metotrexato</b>	2	0.0418	0.9666

A continuación se procedió a efectuar la etapa de predicción con una serie de muestras preparadas para tal efecto cuya composición y valores de recuperación obtenidos, aplicando el modelo optimizado, se muestran en la Tabla IV.5.

Tabla IV.5. Valores de recuperación obtenidos para las muestras de calibración aplicando el modelo PLS-1.

<b>ÁCIDO FÓLICO</b>			<b>METOTREXATO</b>		
Puesto ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Encontrado ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	% R	Puesto ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Encontrado ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	% R
0.512	0.542	106	0.342	0.346	94
0.171	0.231	135	0.854	0.756	92
0.342	0.385	113	0.342	0.340	101
0.137	0.231	169	0.512	0.398	81
0.683	0.716	105	0.154	0.109	85
0.598	0.632	106	0.769	0.739	100
0.154	0.260	169	0.427	0.315	75
Promedio $\pm$ SD		<b>129 <math>\pm</math> 29</b>	Promedio $\pm$ SD		<b>90 <math>\pm</math> 10</b>
Parámetros estadísticos					
<sup>a</sup> RMSEP		0.0640	<sup>a</sup> RMSEP		0.0738
<sup>b</sup> REP, %		17.2	<sup>b</sup> REP, %		15.2

<sup>a</sup>RMSEP: Raíz cuadrada de la media de los errores de predicción al cuadrado.

<sup>b</sup>REP, %: Error relativo de predicción.

Observamos que los valores de recuperación obtenidos para el ácido fólico, así como los parámetros estadísticos, son peores que los obtenidos para el metotrexato. Además, los peores resultados se obtienen cuando uno o ambos analitos están en baja concentración. Esto también se observa al representar gráficamente la concentración

puesta en cada patrón de la matriz de calibración, frente a la concentración predicha para cada analito, Figura IV.27, donde vemos que los valores de recuperaciones obtenidos se alejan de la linealidad

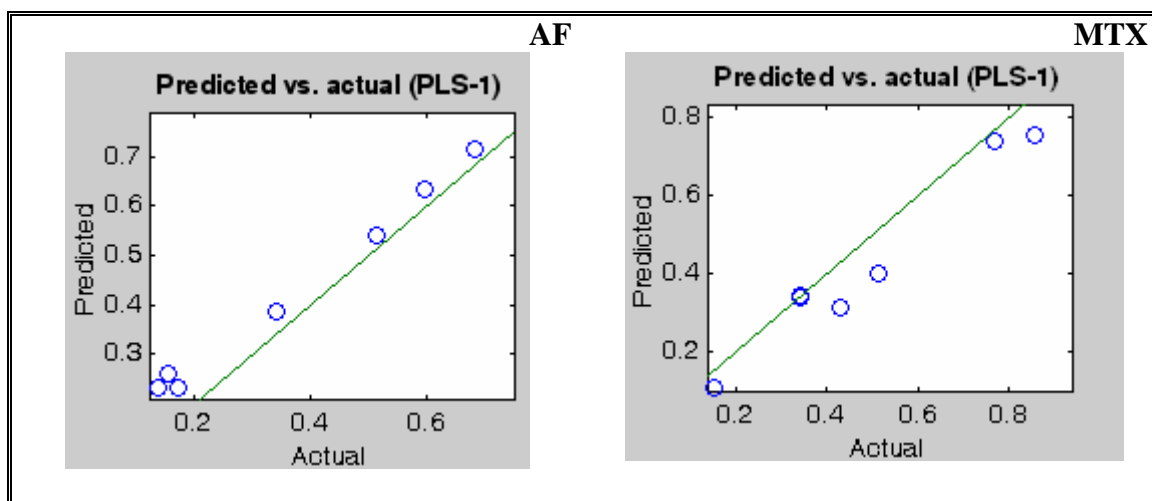


Figura IV.27. Relación entre la concentración añadida y predicha.

Por lo tanto, a partir de estos datos, podemos concluir que, el método de primer orden aplicado, PLS-1, es incapaz de resolver adecuadamente la mezcla de metotrexato y ácido fólico, por lo que, abordaremos la resolución de la mezcla binaria utilizando métodos de calibración multivariante de orden superior.

#### **IV.4. DETERMINACIÓN DE AF Y MTX EMPLEANDO DATOS DE SEGUNDO ORDEN**

El empleo de métodos de calibración de segundo orden, aportan una mayor información analítica y, por tanto, una mayor diferenciación analítica entre los diversos componentes. La aplicación de estos métodos implica la utilización de datos de tres vías, que en este caso serán los espectros de emisión de fluorescencia con el tiempo.

Para ello, se empleó el programa MVC2 (Multivariate Calibration for Second-Order), cuya pantalla principal se presenta en la Figura IV.28, programado bajo el entorno Matlab 5.3 que nos permite emplear diversos algoritmos tales como N-PLS (mínimos cuadrados parciales multidimensionales), U-PLS (mínimos cuadrados parciales concatenados), PARAFAC\_ES y PARAFAC\_IS (análisis factorial paralelo empleando patrones externos o adicción patrón, respectivamente), SWATLD\_ES y SWATD\_IS (descomposición trilineal alternada autoponderada empleando patrones externos o adicción patrón, respectivamente), BLLS (mínimos cuadrados bilineales) y, recientemente, se han añadido los algoritmos N-PLS y U-PLS acoplados a RBL [49, 50]. Permite, asimismo, seleccionar las regiones espectrales apropiadas, optimizar el número de factores, y representar los perfiles en ambos órdenes (longitud de onda de emisión y tiempo en este caso), así como visualizar las gráficas de calibración pseudounivariante.

Vamos a aplicar los diferentes métodos de calibración multivariante indicados, para posteriormente poder realizar una comparación entre ellos.

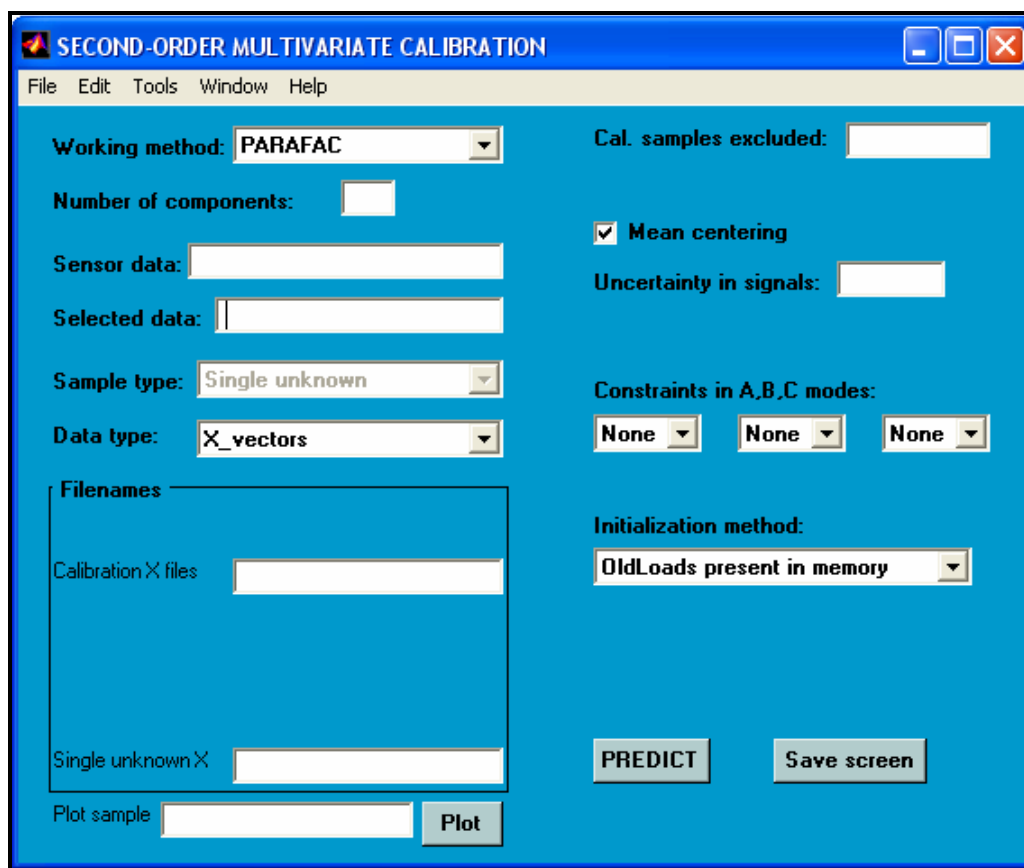


Figura IV.28. Pantalla principal del programa MVC2.

Fijando las condiciones químicas e instrumentales optimizadas previamente, se registraron los espectros de emisión (excitando a 350 nm), en un intervalo de longitudes de onda comprendido entre 400 y 530 nm, y tomando 1 punto cada nm ( $J = 131$ ). La evolución de los espectros se siguió durante 10 minutos, registrando un espectro cada 0.8 minutos ( $K = 13$ ), con lo que se obtenía un total de 1703 puntos espectrales. Para transformar los datos obtenidos, igual que en el caso anterior, empleamos de nuevo el programa INTERFACE. Además, comprobamos la aditividad de las señales utilizando los espectros de emisión de los analitos a distintos tiempos, comprobándose que se cumplía en todo el intervalo de tiempos estudiado.

En la Figura IV.29 se muestra la evolución de los espectros de emisión fluorescentes con el tiempo, para una muestra que contiene  $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$  de cada analito.

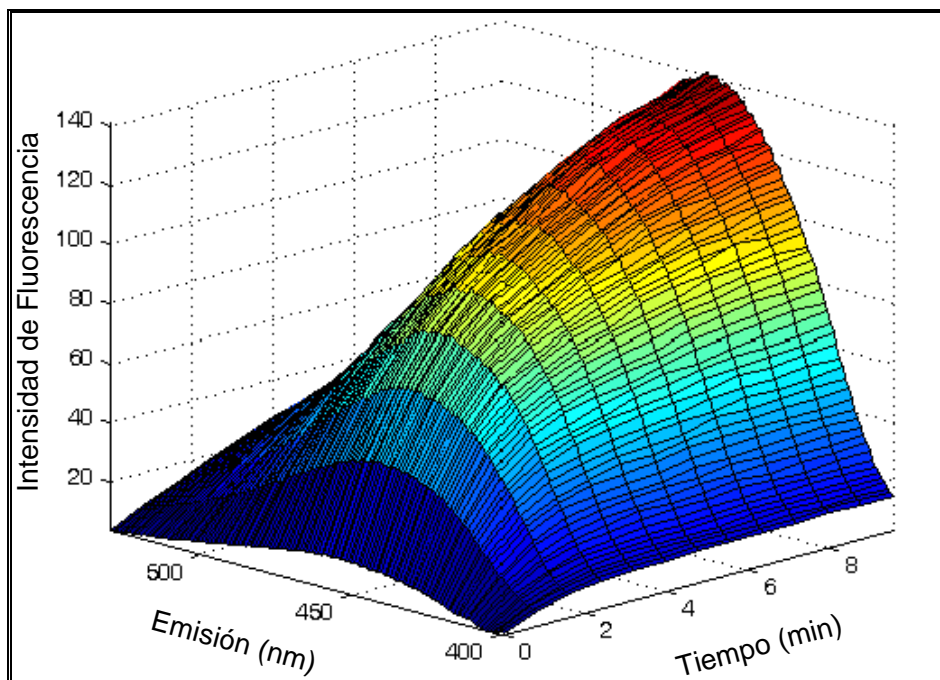


Figura IV.29. Evolución de los espectros de emisión de fluorescencia con el tiempo de reacción.  $[AF] = 0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $[MTX] = 0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

#### IV.4.1. Matriz de calibración y validación del conjunto de predicción

Para la construcción de la matriz de calibración del modelo, de nuevo se siguió un diseño combinando un diseño factorial con tres niveles y un diseño central compuesto, con lo que el número total de muestras necesarias para construir el modelo es trece (P1-P13). El rango de concentraciones empleadas para cada analito fue de  $0-1 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Los valores de concentración empleados se muestran en la Tabla IV.3.

Para evaluar la capacidad de predicción de los diferentes modelos, se preparan un total de siete muestras formadas por mezclas binarias, (T1-T6), construidas con diferentes concentraciones de los analitos, y distintas de las empleadas para la calibración, pero dentro de los mismos rangos de concentraciones. La composición de esta matriz de calibración se recoge en la Tabla IV.6.

Tabla IV.6. Composición del conjunto de validación.

MUESTRA	[AF] $\mu\text{g mL}^{-1}$	[MTX] $\mu\text{g mL}^{-1}$
T1	0.512	0.341
T2	0.341	0.341
T3	0.683	0.154
T4	0.137	0.512
T5	0.597	0.768
T6	0.154	0.427

➤ **Calibración multivariante empleando N-PLS y U-PLS**

Para ambos métodos se realizaron estudios con objeto de seleccionar los intervalos de longitudes de onda y/o tiempos en los que se obtuvieran los mejores valores de los parámetros estadísticos  $R^2$  y PRESS, para cada analito. Los mejores resultados se observaron empleando todo el intervalo tanto de longitudes de onda como de tiempo y los valores obtenidos se presentan en la Tabla IV.7.

El número óptimo de factores se calculó realizando una validación cruzada para el conjunto de patrones de calibración y, de acuerdo con el criterio de Haaland y Thomas [47, 48], obtuvimos un número óptimo de factores igual a 2 para cada analito, que es un resultado lógico teniendo en cuenta que la matriz en la que hemos realizado el análisis es agua, cuya señal de fluorescencia es prácticamente cero y no varía a lo largo del tiempo.

Tabla IV.7. Parámetros estadísticos de los modelos N-PLS y U-PLS para cada componente.

A = 2	N-PLS		U-PLS	
	PRESS	$R^2$	PRESS	$R^2$
Ácido Fólico	0.0318	0.997	0.0321	0.997
Metotrexato	0.0326	0.999	0.0331	0.999

Los modelos optimizados se aplicaron al conjunto de validación y los valores de recuperación obtenidos, se recogen en la Tabla IV.8 y en la Tabla IV.9.

Tabla IV.8. Aplicación del modelo N-PLS a la determinación de AF y MTX en muestras sintéticas.

Ácido Fólico			Metotrexato		
Puesto ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Encontrado ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	% Rec.	Puesto ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Encontrado ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	% Rec.
0.512	0.569	111	0.341	0.341	100
0.341	0.405	117	0.341	0.345	101
0.683	0.675	99	0.154	0.186	120
0.137	0.180	132	0.512	0.474	93
0.597	0.692	116	0.768	0.693	90
0.154	0.194	126	0.427	0.412	98
Promedio $\pm$ SD		<b>117 <math>\pm</math> 11</b>	Promedio $\pm$ SD		<b>100 <math>\pm</math> 10</b>
Parámetros estadísticos					
RMSEP		0.0586	RMSEP		0.0480
REP, %		15.8	REP, %		9.9

Tabla IV.9. Aplicación del modelo U-PLS a la determinación de AF y MTX en muestras sintéticas.

Ácido Fólico			Metotrexato		
Puesto ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Encontrado ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	% Rec.	Puesto ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Encontrado ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	% Rec.
0.512	0.567	111	0.342	0.342	100
0.342	0.402	117	0.342	0.348	102
0.683	0.677	99	0.154	0.185	120
0.137	0.180	132	0.512	0.475	93
0.598	0.691	115	0.769	0.694	90
0.154	0.192	124	0.427	0.414	97
Promedio $\pm$ SD		<b>116 <math>\pm</math> 11</b>	Promedio $\pm$ SD		<b>100 <math>\pm</math> 11</b>
Parámetros estadísticos					
RMSEP		0.0579	RMSEP		0.0482
REP, %		15.6	REP, %		9.9

Otra forma de analizar los datos obtenidos es representar las concentraciones actuales, frente a las concentraciones predichas, para cada analito y con cada algoritmo tal como se ha hecho en la Figura IV.30.

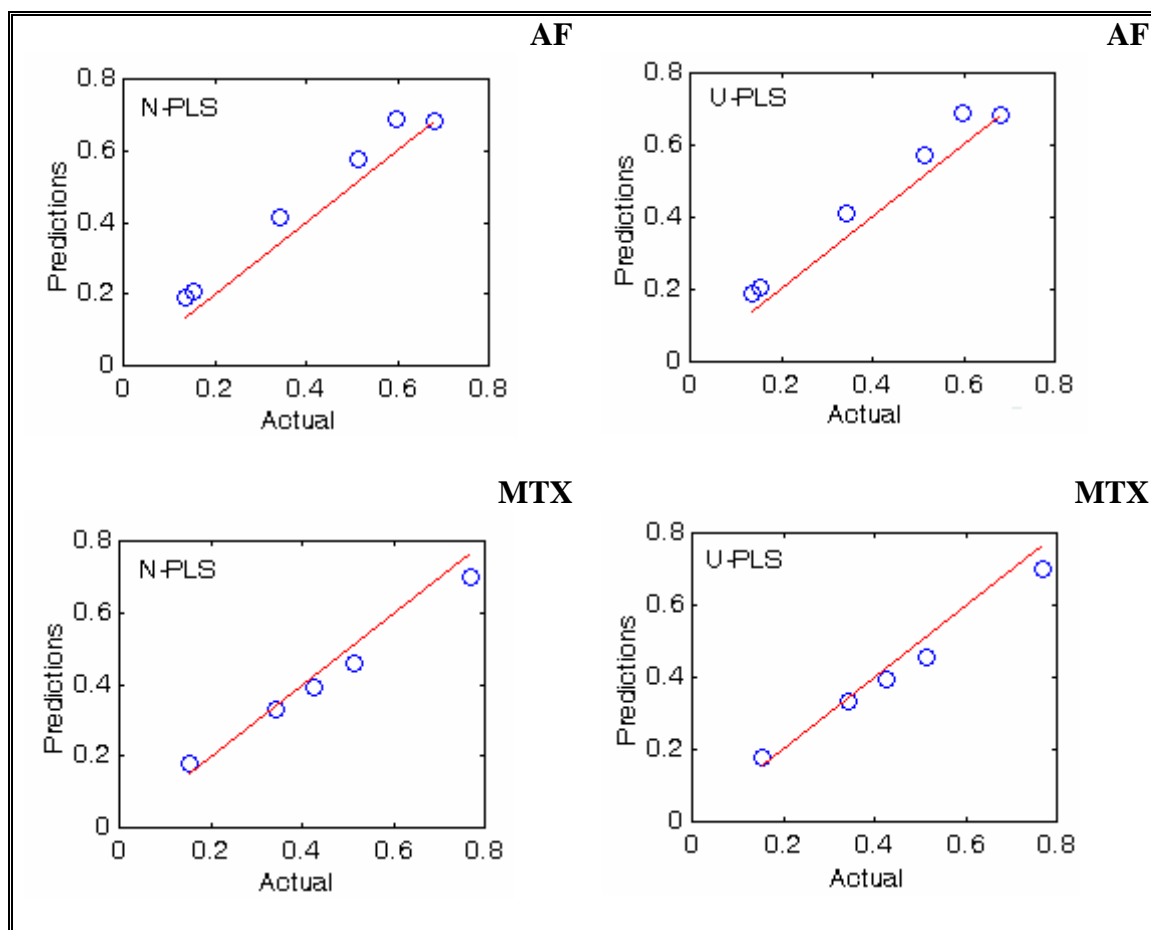


Figura IV.30. Relación entre la concentración teórica y predicha de AF y MTX empleando N-PLS y U-PLS.

Con ambos métodos se obtienen recuperaciones similares siendo, en general, mejores que las obtenidas al aplicar PLS-1, ya que tenemos mayor información y, por lo tanto, mayor diferenciación entre ambos componentes.



Observamos que los peores valores de recuperación se obtienen para los valores de concentración más bajos y los resultados son algo mejores en el caso de la determinación de metotrexato.

➤ ***Calibración multivariante empleando PARAFAC, SWATLD y BLLS***

De nuevo se optimizó el intervalo de los sensores para realizar las calibraciones, observándose que en el caso de PARAFAC y SWATLD, mejoraban los resultados cuando la calibración se realizaba empleando un intervalo de longitudes de onda de emisión comprendido entre 410 y 480 nm, tomando 1 punto cada nm, ( $J = 71$ ) y se utilizaban los espectros de emisión obtenidos en los primeros 6.4 minutos (se obtiene un espectro cada 48 segundos) ( $K = 9$ ). Con esta nueva selección (639 puntos espectrales), el tiempo de análisis disminuía considerablemente para ambos algoritmos. Al aplicar BLLS, se obtenían mejores resultados empleando todo el intervalo, al igual que ocurría con PLS.

La determinación del número óptimo de factores en PARAFAC se realizó utilizando el método denominado Core Consistency Diagnostic (Corcondia). En este caso, en el que tenemos un total de dos componentes en muestras preparadas en ausencia de interferentes, es de esperar que el número óptimo de factores sea igual o superior a dos. Se analizaron, una a una, todas las muestras del conjunto de validación, encontrándose, en todos los casos, un número óptimo de factores es de 2, como puede observarse en la Figura IV.31 para el caso de la muestra T5.

El algoritmo SWATLD es insensible a un exceso de factores en el proceso de cálculo y también se seleccionó como número óptimo de factores el de 2. Observamos como la velocidad de cálculo de esta metodología es muy superior a PARAFAC

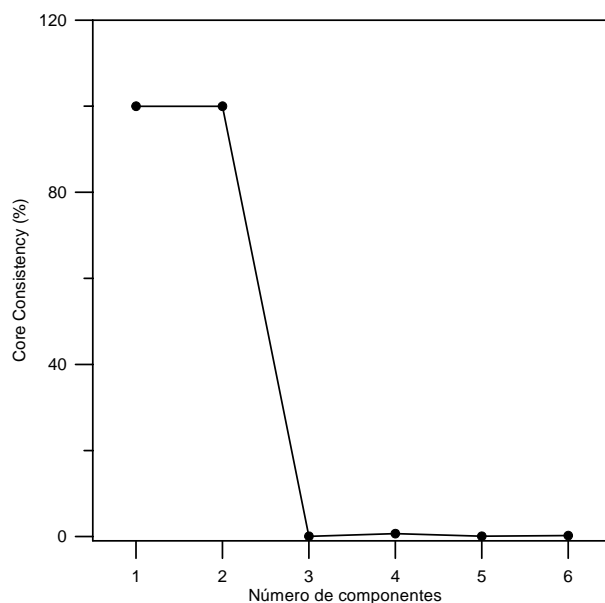


Figura IV.31. Representación del Core Consistency en función del número de factores para la muestra T5.

La determinación del número óptimo de factores, en el caso de BLLS, se realizó analizando la variación del *error de regresión*, que se obtiene al representar la concentración teórica de cada analito, en las muestras del conjunto de calibración, en función de la concentración predicha por el modelo, encontrando de nuevo un número de factores igual a 2.

Los perfiles de emisión y de tiempo obtenidos por cada uno de estos algoritmos, al procesar la muestra T1, utilizando el intervalo de los sensores optimizados en cada caso y utilizando un número de factores igual a 2, se muestran en la Figura IV.32.

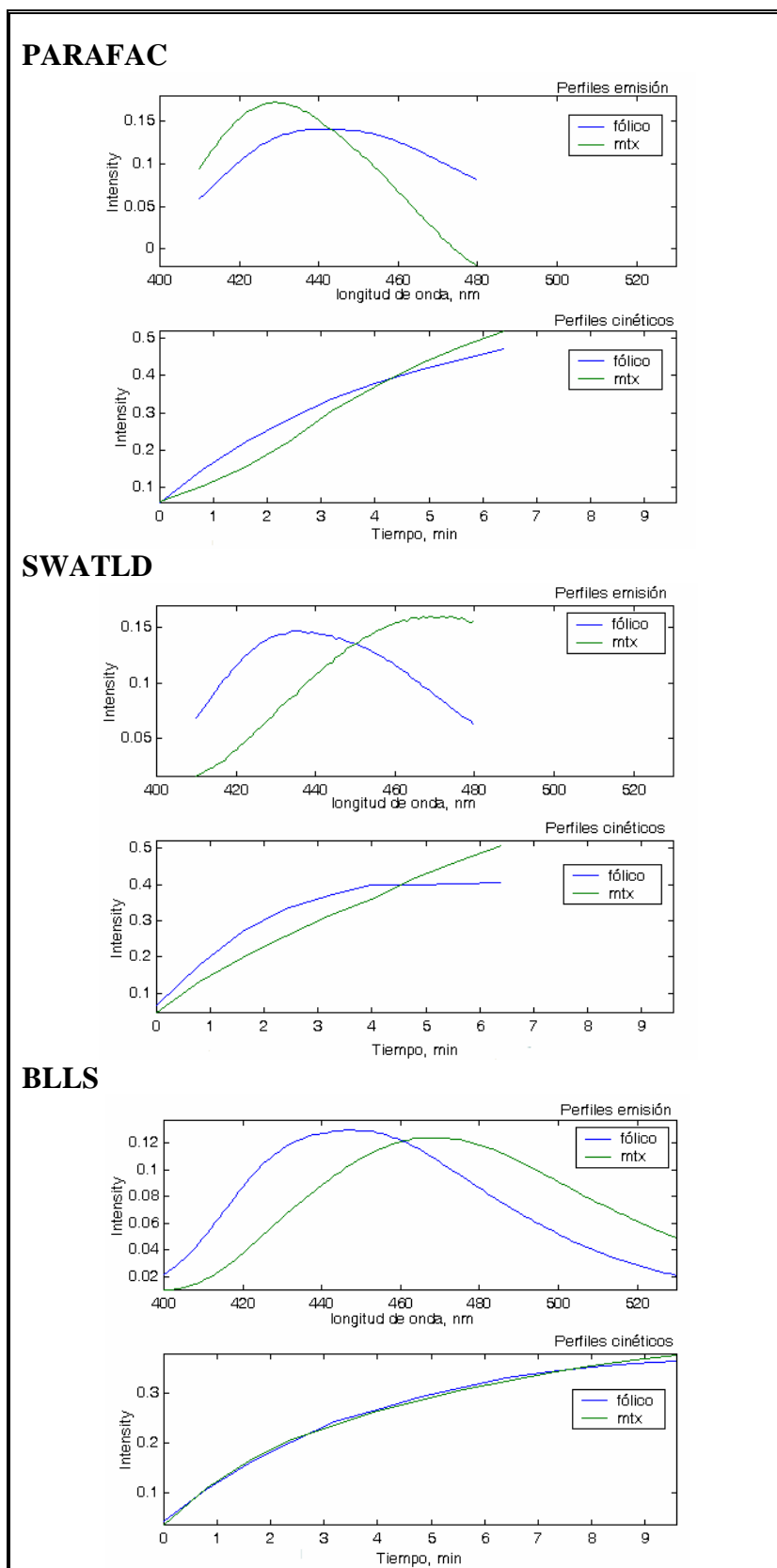


Figura IV.32. Perfiles de la muestra T1 obtenidos al aplicar PARAFAC, SWATLD, y BLLS.

En las Tablas IV.10, IV.11 y IV.12 se reúnen los parámetros estadísticos y las recuperaciones obtenidas del análisis del conjunto de validación con cada uno de los algoritmos.

Tabla IV.10. Recuperaciones obtenidas al aplicar PARAFAC en muestras sintéticas.

Ácido Fólico			Metotrexato		
Puesto ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Encontrado ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	% R	Puesto ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Encontrado ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	% R
0.512	0.539	105	0.342	0.456	133
0.342	0.445	130	0.342	0.520	152
0.683	0.496	73	0.154	0.270	175
0.137	0.318	232	0.512	0.333	65
0.598	0.807	135	0.769	0.550	72
0.154	0.345	224	0.427	0.535	125
Promedio $\pm$ SD		<b>150 <math>\pm</math> 66</b>	Promedio $\pm$ SD		<b>120 <math>\pm</math> 46</b>
Parámetros estadísticos					
RMSEP		0.1629	RMSEP		0.1580
REP, %		38.0	REP, %		21.1

Tabla IV.11. Recuperaciones obtenidas al aplicar SWATLD en muestras sintéticas.

Ácido Fólico			Metotrexato		
Puesto ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Encontrado ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	% R	Puesto ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Encontrado ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	% R
0.512	0.642	125	0.342	0.454	133
0.342	0.457	134	0.342	0.503	147
0.683	0.481	70	0.154	0.127	82
0.137	0.227	166	0.512	0.442	86
0.598	0.753	126	0.769	0.981	128
0.154	0.303	197	0.427	0.399	93
Promedio $\pm$ SD		<b>136 <math>\pm</math> 43</b>	Promedio $\pm$ SD		<b>112 <math>\pm</math> 27</b>
Parámetros estadísticos					
RMSEP		0.1445	RMSEP		0.1224
REP, %		44.6	REP, %		19.7

Tabla IV.12. Recuperaciones obtenidas al aplicar BLLS en muestras sintéticas.

<b>Ácido Fólico</b>			<b>Metotrexato</b>		
Puesto ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Encontrado ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	% R	Puesto ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Encontrado ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	% R
0.512	0.627	122	0.342	0.279	82
0.342	0.422	123	0.342	0.323	94
0.683	0.789	116	0.154	0.072	47
0.137	0.109	80	0.512	0.543	106
0.598	0.695	116	0.769	0.691	90
0.154	0.141	92	0.427	0.461	108
Promedio $\pm$ SD		<b>108 <math>\pm</math> 18</b>	Promedio $\pm$ SD		<b>88 <math>\pm</math> 22</b>
Parámetros estadísticos					
RMSEP		0.0829	RMSEP		0.0566
REP, %		20.5	REP, %		13.3

En las tablas anteriores podemos observar como, en todos los casos y, al igual que ocurría al aplicar N-PLS y U-PLS, los resultados obtenidos para el ácido fólico son peores que los obtenidos para el metotrexato, obteniéndose unos valores del error relativo de predicción aproximadamente del doble. Además, empleando PARAFAC y SWATLD, las muestras con menor concentración de ácido fólico fueron las que peores valores de recuperación proporcionaron.

Respecto al metotrexato, se obtuvieron resultados más satisfactorios en todos los casos, especialmente al aplicar PARAFAC. No obstante, las desviaciones de las recuperaciones obtenidas para ambos analitos fueron muy elevadas en todos los casos, teniendo en cuenta que las determinaciones se están realizando en muestras sintéticas, por lo que no consideramos satisfactorios los resultados obtenidos por los métodos de calibración multivariante de segundo orden aplicados.

#### **IV.5. DETERMINACIÓN DE AF Y MTX EMPLEANDO DATOS DE TERCER ORDEN**

Como hemos podido comprobar, empleando calibración multivariante de segundo orden no hemos resuelto satisfactoriamente el problema planteado en muestras sintéticas. La complejidad del problema planteado se debe, probablemente, a la similitud existente tanto en las cinéticas de oxidación de ambos analitos como en la evolución de los espectros de emisión de ambos productos, por lo que pensamos que, en teoría, al introducir una dimensión adicional al conjunto de datos de tres vías, se lograría un incremento de la selectividad. Además, la utilización de datos con una estructura dimensional mayor, 4 vías o tercer orden, aportará métodos que serán aún más robustos frente a la presencia de interferencias y a los efectos de matriz.

Utilizaremos como señal analítica la evolución de las matrices de excitación-emisión (EEMs) con el tiempo.

Todos los cálculos se realizarán empleando el programa informático MVC3 (Multivariate Calibration for Third-Order), programado bajo el entorno Matlab 5.3. Hemos de disponer de un conjunto de datos en formato ASCII, bien en una, en dos o en tres columnas. Para transformar los datos que obtenemos del espectrofluorímetro, podemos emplear el programa Sigma Plot 9.0 o bien el programa INTERFACE descrito anteriormente.

Si empleamos el programa Sigma Plot es necesario seguir los siguientes pasos:

- 1) Abrir el archivo que queremos transformar.
- 2) Desplegar la ventana “transforms” y pinchamos en “user definer” para abrir la rutina denominada “Transform”, Figura IV.33, y manteniendo presionada la tecla *Insert*, pinchamos en *Run* (mantenemos presionada la tecla hasta que se hayan transformado todos los datos).

```

for i=2 to 420 step 2 do col(424)=col(i;3;25)
end for
for j=1 to 419 step 2 do col(423)=col(j;3;25)
end for
    
```

Figura IV.33. Rutina “Transform” del programa Sigma Plot.

Operando de esta manera los datos se ordenarán en dos columnas, que se copian y pegan en una hoja del bloc de notas, así tendrán la extensión *.txt* necesaria para MVC3 (los decimales han de ser puntos y no comas).

Si empleamos el programa INTERFACE, los datos se ordenarán en una sola columna y los pasos a seguir son los siguientes:

- 1) Abrir el fichero obtenido del espectrofluorímetro Varian con extensión *.csv* con un programa como Grapher o Excel y se guarda con la extensión *ascii.txt*.
- 2) Transformar ese archivo con extensión *.txt* en otro también con extensión *.txt* con el formato adecuado. Para ello, completamos la ventana de “rango espectral” poniendo entre comas la longitud de onda de emisión inicial, la final, el incremento, la longitud de onda de excitación inicial, final y el incremento.
- 3) En “ciclos temporales” ponemos el número de matrices que hemos registrados y pinchamos en “V 3 orden”, generándose el archivo que necesitamos para trabajar con el programa MVC3.

El programa MVC3, cuya pantalla principal se presenta en la Figura IV.34, permite trabajar con los algoritmos N-PLS, PARAFAC y TLLS y, además, nos facilita la selección apropiada de la región espectral de trabajo, dibujando los perfiles de excitación y emisión, los perfiles cinéticos y los gráficos de calibración pseudo-univariante.

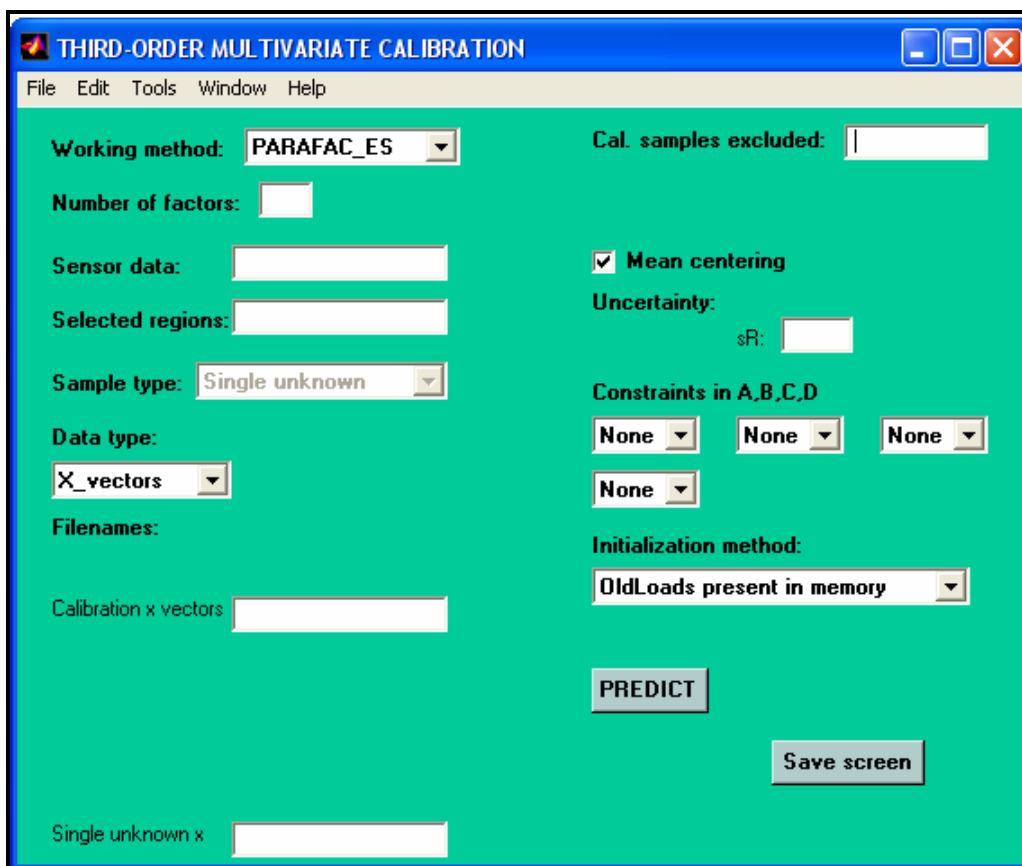


Figura IV.34. Pantalla principal del programa MVC3.

Actualmente, se ha modificado este programa y se han introducido los algoritmos N-PLS y U-PLS acoplados al procedimiento RTL.



➤ *Optimización de las variables instrumentales*

Como ya hemos indicado, vamos a utilizar como señal analítica la evolución de las EEMs con el tiempo, por lo que tenemos que seleccionar los intervalos más adecuados tanto de longitudes de onda de excitación como de emisión. Para ello registramos las matrices de los productos de oxidación obtenidos a partir de una disolución de ácido fólico, de una disolución de metotrexato y de una disolución que contenía ambos analitos. En la Figura IV.35 se muestran los mapas de contorno de las EEM de los productos de oxidación de cada analito y, en la Figura IV.36, de la mezcla de ambos. En todas las figuras se observa la presencia de las señales de dispersión Rayleigh (R) y del segundo armónico de dispersión de los monocromadores (H).

Con objeto de evitar incluir las señales debidas a las dispersiones anteriormente mencionadas, que no aportan información útil, seleccionamos la zona de 260 a 380 nm, con un incremento de 6 nm para excitación, donde se encuentran los dos máximos del producto de oxidación del AF (274 y 355 nm) y un solo máximo del producto de oxidación del MTX (335 nm) y de 400 a 510 nm, con un incremento de 5 nm para emisión, donde encontramos un máximo para el producto de oxidación del AF (446 nm) y el máximo del producto de oxidación del MTX (469 nm).

En los estudios anteriores comprobamos que la reacción se completaba en 600 segundos, por lo que registramos las EEMs durante 10 minutos, una por minuto. De este modo, se registraron las EEM del conjunto de calibración y de validación (Tabla IV.3 y Tabla IV.6), bajo las condiciones químicas previamente optimizadas, Tabla IV.2.

En la Figura IV.37 podemos ver los mapas de contorno de la evolución de las EEMs con el tiempo, de una mezcla de ácido fólico y metotrexato en disolución acuosa y en presencia de permanganato potásico. Se observa que la intensidad de fluorescencia aumenta considerablemente con el tiempo de reacción.

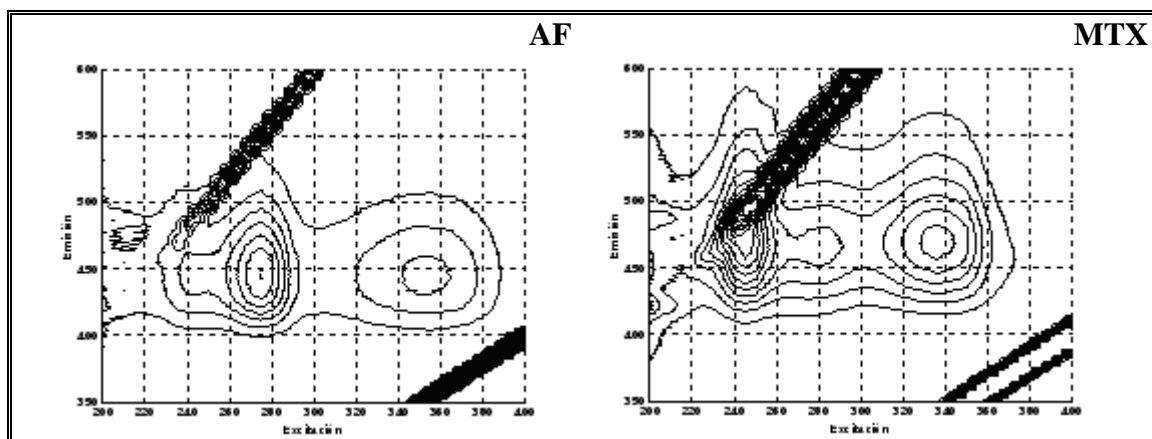


Figura IV.35. Mapas de contornos de las EEMs del producto de oxidación obtenido a partir de  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  de AF y de  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  de MTX.

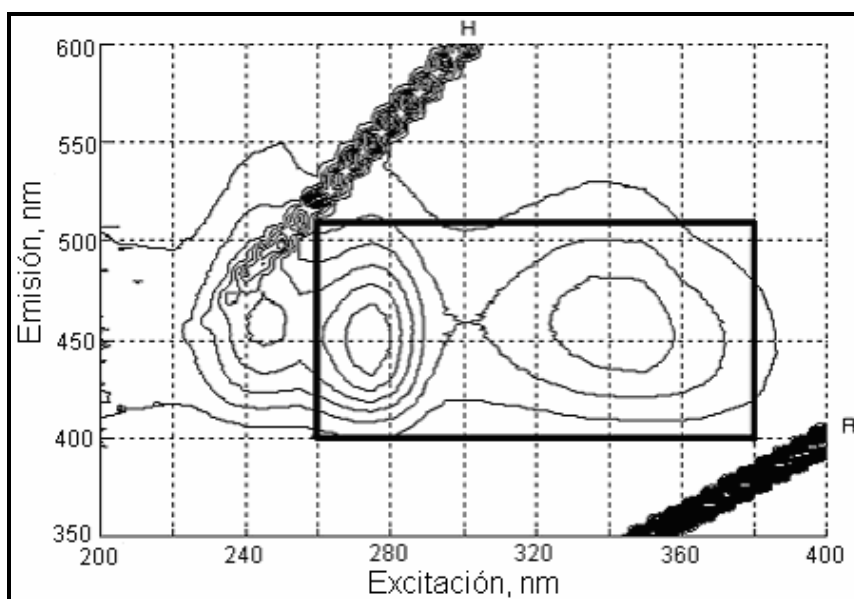


Figura IV.36. Mapa de contorno de la EEM de los productos de oxidación de una mezcla de  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  AF y  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  de MTX con  $\text{KMnO}_4$ .

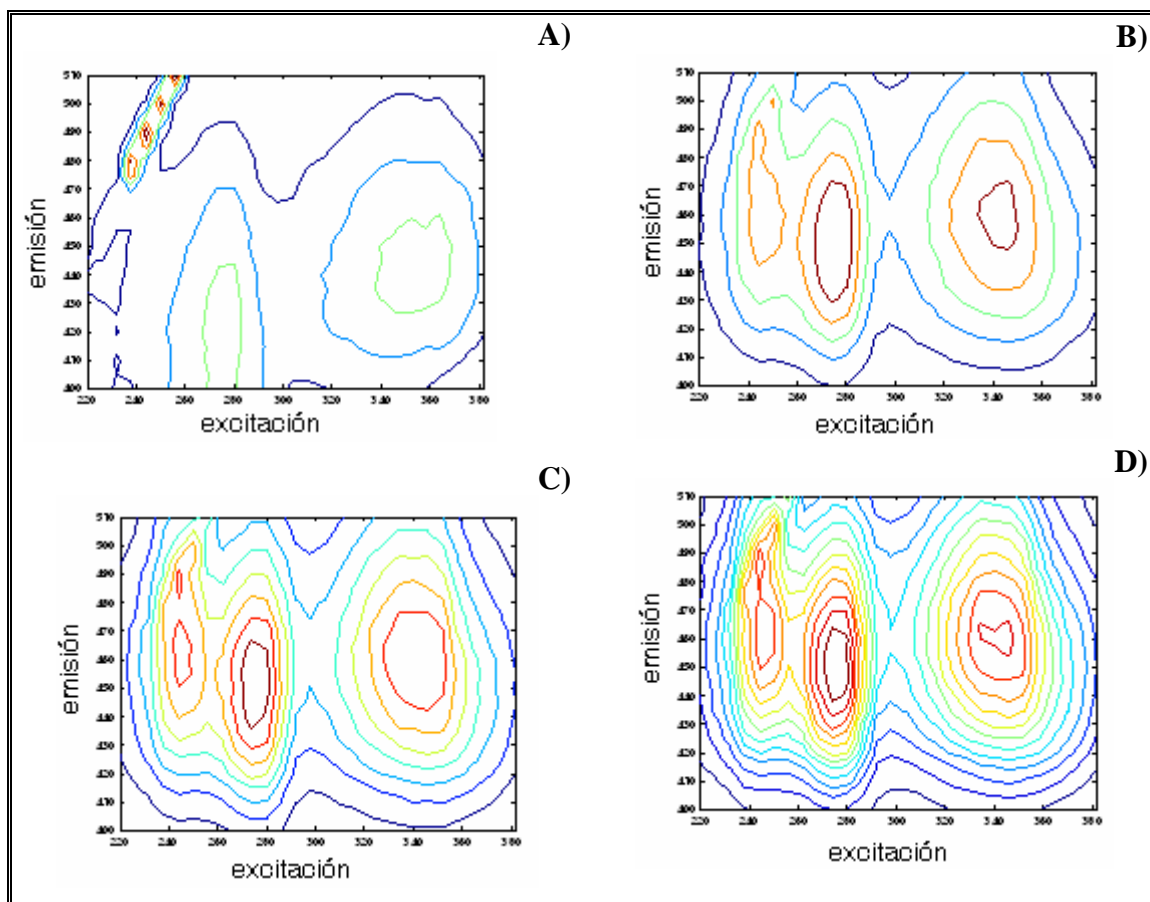


Figura IV.37. Mapas de contorno de las EEMs de una mezcla de  $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$  AF y  $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$  de MTX en presencia de  $\text{KMnO}_4$  a pH 3.4. Los tiempos seleccionados para ilustrar la evolución cinética de las EEMs fueron: **A)** 0 min, **B)** 3 min, **C)** 6 min y **D)** 9 min.

#### Optimización de la velocidad de registro de las matrices

Nos interesa que cada EEM se registre en el menor tiempo posible, para que sea como una foto del producto de oxidación de los analitos, sin que ello implique una gran distorsión ni un aumento del ruido instrumental en la señal. Se comprobó que con una velocidad de registro de  $24000 \text{ nm /min}$  el tiempo en que se registraba una EEM era de 12 segundos.

➤ *Aditividad de las señales*

Establecidos los parámetros químicos e instrumentales, se comprobó la aditividad de las señales en las distintas matrices en las que se aplicará la determinación de los analitos: agua y orina. Para ello, se registraron las EEM de los productos de oxidación a distintos tiempos y se midió la intensidad de fluorescencia de los máximos encontrados, tanto en las mezclas como con cada analito individual. Comprobamos que la suma de las intensidades de fluorescencia de los máximos del producto de oxidación del AF y del MTX, coincidía con las intensidades de los máximos de los productos de oxidación de la mezcla de ambos. A modo de ejemplo, se representan en la Figura IV.38 los mapas de contorno en orina, registrados a un tiempo de 9 minutos.

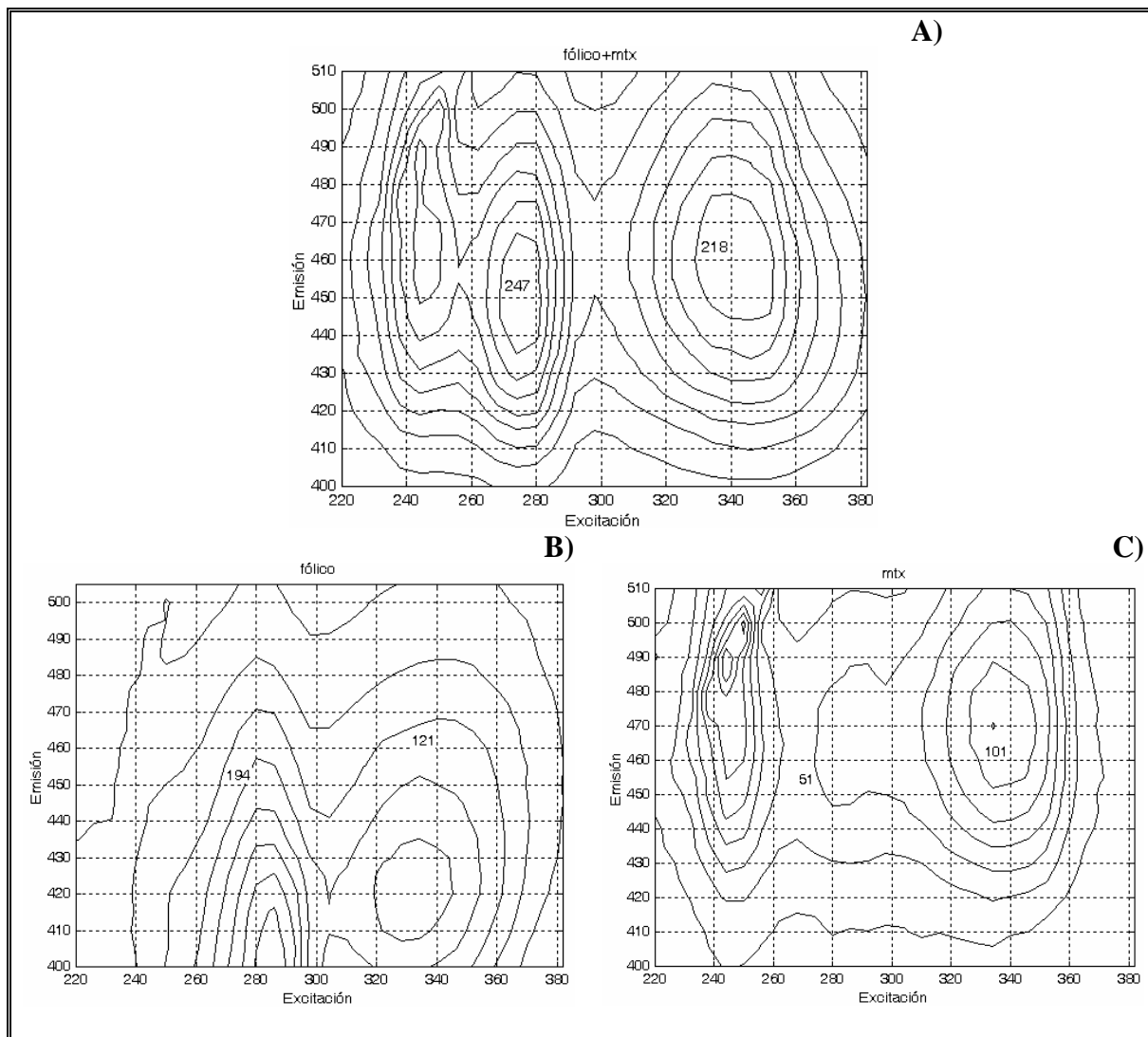


Figura IV.38. Mapas de contorno a tiempo 9 min de los productos de oxidación de **A)** una mezcla de  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  de AF y  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  de MTX, **B)**  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  de AF y **C)**  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  de MTX, en presencia de permanganato potásico, en muestras de orina (dil: 300).

De igual forma, estudiamos la aditividad de las EEM a todos los tiempos, encontrando que se cumplía a partir de un tiempo de 3 minutos, tiempo necesario para tmostatizar la cubeta.

➤ **Calibración multivariante empleando N-PLS, PARAFAC y TLLS**

En las condiciones instrumentales seleccionadas como óptimas, se registraron las EEMs con el tiempo tanto de los patrones de calibración, Tabla IV.3, como del conjunto de validación, Tabla IV.6, y se analizaron los datos de tercer orden con los algoritmos previamente mencionados: N-PLS, PARAFAC y TLLS.

Para determinar la región del espectro que nos proporcionaba mejores resultados para cada analito, se empleó N-PLS y se hizo la validación cruzada modificando el intervalo de los sensores (longitudes de onda y tiempo). El análisis del coeficiente de regresión y el factor PRESS (suma de los cuadrados de los errores residuales), nos permitió determinar las zonas de análisis óptimas para cada componente. Los intervalos óptimos, tanto de longitudes de onda como de tiempo, se resumen en la Tabla IV.13.

Para determinar del número óptimo de factores, empleando N-PLS, se utilizó el método de validación cruzada y se siguió el criterio de Haaland y Thomas, encontrando un número óptimo de factores de 2 para cada analito. En la Tabla IV.13 se muestran los parámetros estadísticos obtenidos.

Tabla IV.13. Intervalos óptimos y parámetros estadísticos, para cada analito, empleando N-PLS.

	N-PLS			
	Intervalos óptimos	Factores	PRESS	R <sup>2</sup>
<b>Ácido Fólico</b>	Emisión: 420-505 nm Excitación: 266-374 nm Tiempo: 0-5 min	2	0.1558	0.9988
<b>Metotrexato</b>	Emisión: 455-510 nm Excitación: 302-362 nm Tiempo: 0-5 min	2	0.0239	0.9986

Empleando PARAFAC, se analizó el valor del *core consistency* para determinar el número óptimo de factores, así como el error de la regresión puesto/encontrado. Aplicando TLLS, se analizó de nuevo el error de la regresión y, en ambos casos, encontramos un número óptimo de factores igual a 2, para cada uno de los analitos.

Las predicciones obtenidas para el conjunto de validación, así como los parámetros estadísticos obtenidos para los tres métodos ensayados, se muestran en las Tablas IV.14, IV.15 y IV.16.

Tabla IV.14. Recuperaciones obtenidas al aplicar N-PLS en muestras sintéticas.

<b>Ácido Fólico</b>			<b>Metotrexato</b>		
Puesto ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Encontrado ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	% Recup.	Puesto ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Encontrado ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	% Recup.
0.512	0.504	98	0.342	0.316	92
0.342	0.350	103	0.342	0.338	99
0.683	0.675	99	0.154	0.160	104
0.137	0.134	98	0.512	0.516	101
0.598	0.645	108	0.769	0.809	105
0.154	0.167	109	0.427	0.432	101
Promedio $\pm$ SD		<b>102 <math>\pm</math> 5</b>	Promedio $\pm$ SD		<b>100 <math>\pm</math> 5</b>
Parámetros estadísticos					
RMSEP		0.0207	RMSEP		0.0199
REP, %		5.1	REP, %		4.7

Tabla IV.15. Recuperaciones obtenidas al aplicar PARAFAC en muestras sintéticas.

<b>Ácido Fólico</b>			<b>Metotrexato</b>		
Puesto ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Encontrado ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	% Recup.	Puesto ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Encontrado ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	% Recup.
0.512	0.503	98	0.342	0.326	95
0.342	0.335	98	0.342	0.352	103
0.683	0.703	103	0.154	0.162	106
0.137	0.130	95	0.512	0.549	107
0.598	0.594	99	0.769	0.835	109
0.154	0.126	82	0.427	0.458	107
Promedio $\pm$ SD		<b>96 <math>\pm</math> 7</b>	Promedio $\pm$ SD		<b>104 <math>\pm</math> 5</b>
Parámetros estadísticos					
RMSEP		0.0152	RMSEP		0.0344
REP, %		3.7	REP, %		8.1

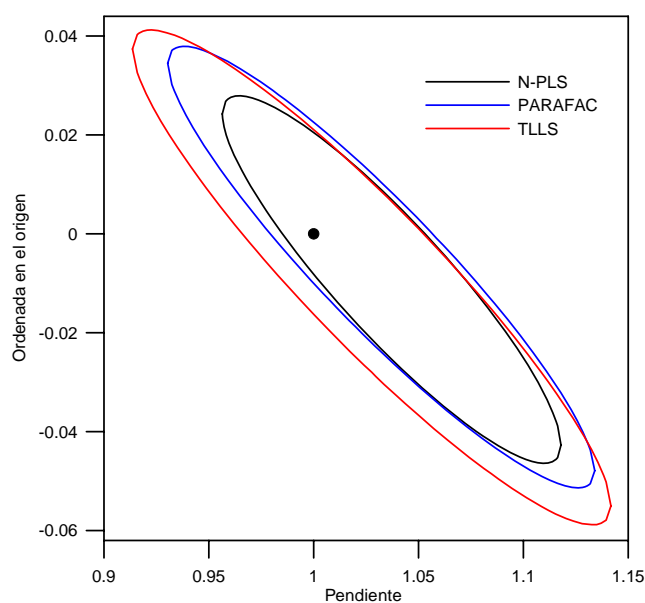
Tabla IV.16. Recuperaciones obtenidas al aplicar TLLS en muestras sintéticas.

<b>Ácido Fólico</b>			<b>Metotrexato</b>		
Puesto ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Encontrado ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	% Recup.	Puesto ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Encontrado ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	% Recup.
0.512	0.492	96	0.342	0.326	95
0.342	0.325	95	0.342	0.345	101
0.683	0.679	99	0.154	0.166	108
0.137	0.131	95	0.512	0.526	103
0.598	0.644	108	0.769	0.837	109
0.154	0.123	80	0.427	0.439	103
Promedio $\pm$ SD		<b>95 <math>\pm</math> 9</b>	Promedio $\pm$ SD		<b>103 <math>\pm</math> 5</b>
Parámetros estadísticos					
RMSEP		0.0252	RMSEP		0.0299
REP, %		6.2	REP, %		7.0



Analizando las tablas anteriores podemos considerar satisfactorios los valores de recuperación obtenidos para ambos analitos, así como los parámetros estadísticos, con los tres métodos empleados. Además, podemos comprobar la disminución de los errores de predicción con estos métodos de tercer orden, en comparación con los obtenidos utilizando métodos de primer y segundo orden.

Comparamos los valores de concentración predichos por cada método con el valor teórico, para un nivel de confianza del 95 %, con objeto de averiguar si existen diferencias estadísticamente significativas entre ellos. Para ello, aplicamos el test de la elipse, EJCR (elliptical joint confidence region) [51, 52], con ayuda del programa informático ACOC, obteniendo las elipses que se muestran en la Figura IV.39.



*Figura IV.39. EJCR al comparar las concentraciones teóricas con las predichas por cada uno de los métodos de calibración de tercer orden empleados.*

Puede apreciarse como, en todos los casos, el punto teórico (1, 0) está dentro de la elipse, lo que nos indica la precisión de estos métodos, no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones teóricas y las predichas, para cada analito, al nivel de confianza elegido. Además, los tamaños de las elipses son

similares, lo que nos sugiere que las tres metodologías quimiométricas muestran similar capacidad predictiva, aún cuando TLLS presenta el mayor tamaño de la elipse, lo que indica menor poder de predicción.

Después de comprobar la validez de los métodos de calibración de tercer orden, en la resolución de la mezcla de ácido fólico y metotrexato en muestras sintéticas, se procedió a su ensayo en muestras de orina. Para ello, y teniendo en cuenta las consideraciones anteriores, emplearemos el método PARAFAC, que es el más ampliamente utilizado en bibliografía para este tipo de análisis y que dispone de la ventaja de segundo orden y, el método N-PLS.

#### **IV.5.1. *Determinación de AF y MTX en muestras de orina***

Una vez optimizados los modelos de calibración multivariante con datos de tercer orden, que permiten la resolución de la mezcla de AF y MTX, se han aplicado a la determinación de estos analitos en muestras de orina.

En todos los ensayos previos realizados con diferentes muestras de orina, sometidas a distintas diluciones, no se observaron diferencias entre la señal de las muestras de orina sin contaminar y aquellas otras muestras que habían sido contaminadas previamente. Esto, probablemente, era debido a que el permanganato potásico empleado se consumía en la oxidación de distintos componentes de la orina, y no en la oxidación del metotrexato y del ácido fólico, por lo que decidimos aumentar la concentración de permanganato potásico, empleando finalmente un valor de  $1.4 \times 10^{-4}$  M, lo que nos aseguraba un exceso suficiente como para asegurar la completa oxidación de los analitos.

Sin embargo, al aumentar la concentración de  $\text{KMnO}_4$ , aumentaba también la cinética de oxidación de los analitos y comprobamos que en 7 minutos se habían completado las reacciones de oxidación. Esto nos permitió reducir el número de

matrices siendo solo necesario registrar las EEMs durante ese intervalo de tiempo y registramos 1 EMM cada 42 segundos.

Una vez optimizada de nuevo la concentración de  $\text{KMnO}_4$  y el tiempo de las reacciones de oxidación, las muestras de orina, antes de ser analizadas, se someten al siguiente tratamiento:

- 1) Añadir 0.12 mL de orina a un matraz de 10 mL.
- 2) Contaminar la orina con los analitos de interés y diluir con agua hasta enrase.
- 3) Dejar transcurrir 30 minutos para favorecer las posibles interacciones entre los analitos y la matriz de orina.
- 4) Tomar 1 mL, llevarlo a la cubeta de medida del espectrofluorímetro, añadir 1 mL de disolución reguladora ácido cloroacético/cloroacetato sódico 0.12 M y, finalmente, 1 mL de  $\text{KMnO}_4$   $4.2 \times 10^{-4}$  M.

Siguiendo este procedimiento, la dilución total de la orina es de 250 veces, lo que implica que, con el rango de calibración realizado, se podrá determinar AF y MTX en muestras de orina que contengan hasta una concentración de  $250 \text{ mg L}^{-1}$ . Para el MTX, estos valores son comparables con los encontrados en pacientes sometidos a terapia [53, 54]

A las disoluciones de orina, sometidas al tratamiento anterior, se les registraron las EEMs en función del tiempo de oxidación, bajo las condiciones experimentales ya mencionadas y empleando los intervalos de longitudes de onda y de tiempo previamente optimizados. Los datos se analizaron mediante PARAFAC, encontrando un número óptimo de factores igual a 3, cuando las determinaciones se realizaban en orina.

En la Figura IV.40 se muestran los perfiles de emisión, excitación y tiempo obtenidos con PARAFAC al procesar la muestra 2 (Tabla IV.17), junto con el conjunto de calibración. Cada componente aparece en orden a su contribución a la varianza total del modelo y, en este caso, la interferencia (la orina) aparece en segundo lugar,

indicando que es la segunda fuente que contribuye a la fluorescencia total en este conjunto de datos en particular. El AF aparece en primer lugar y el MTX en tercero.

En la Tabla IV.17 se muestran las recuperaciones obtenidas al aplicar N-PLS y PARAFAC en las muestras de orina fortificadas.

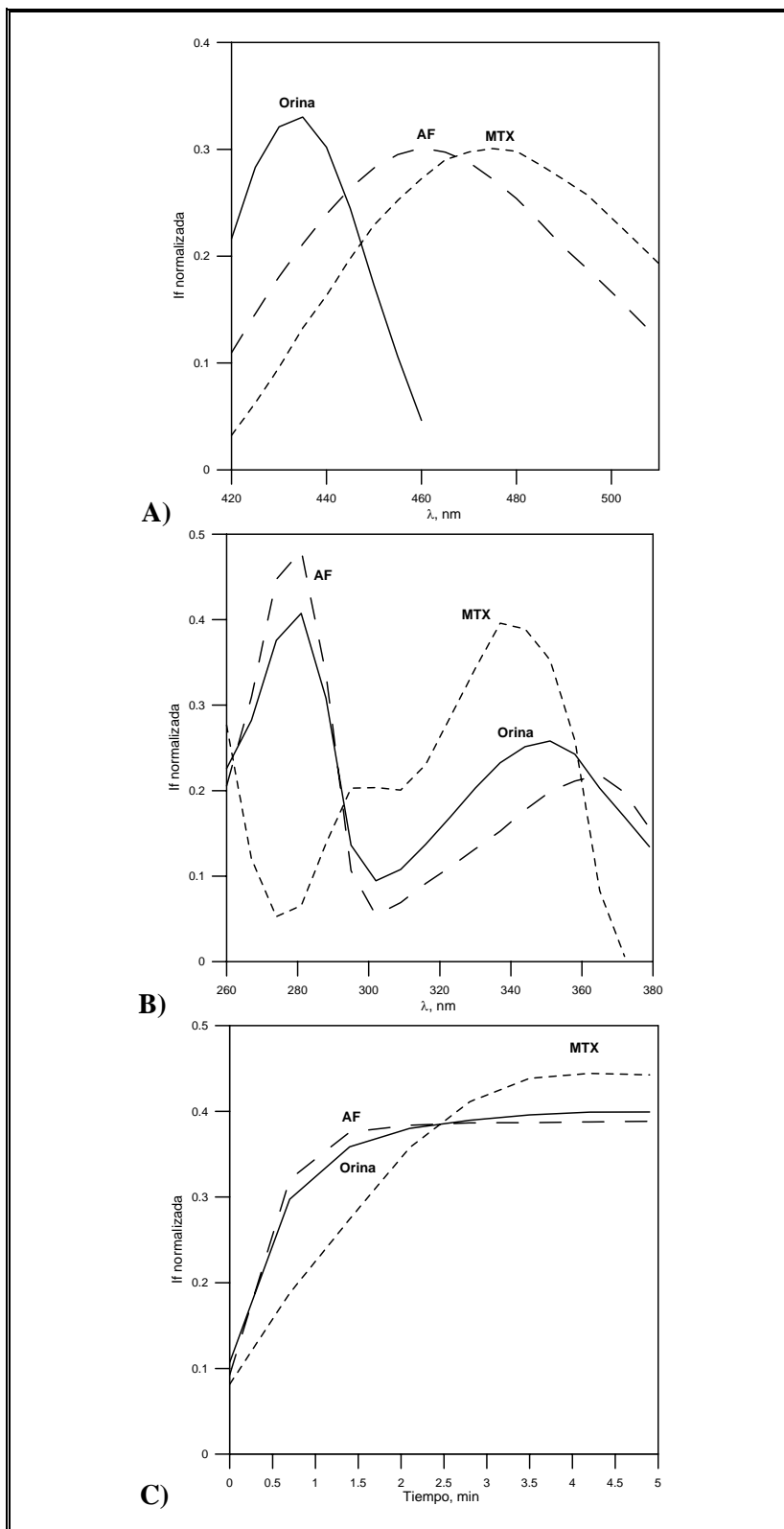


Figura IV.40. Perfiles de emisión A), excitación B) y cinéticos C) obtenidos al aplicar PARAFAC a una muestra de orina contaminada.

Tabla IV.17. Recuperaciones obtenidas al aplicar N-PLS y PARAFAC en muestras de orina fortificadas.

AF					MTX				
N-PLS			PARAFAC		N-PLS			PARAFAC	
Puesto ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Predicho ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Rec. (%)	Predicho ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Rec. (%)	Puesto ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Predicho ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Rec. (%)	Predicho ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Rec. (%)
0.511	0.508	99	0.401	79	0.338	0.391	116	0.357	106
0.340	0.372	109	0.340	100	0.338	0.300	89	0.295	87
0.681	0.618	91	0.628	92	0.152	0.268	176	0.170	112
0.136	0.230	169	0.121	89	0.506	0.440	87	0.409	81
0	-	-	-	-	0.962	0.818	85	0.952	99
0.987	0.846	86	0.736	75	0	-	-	-	-
0.680	0.480	70	0.522	77	0.675	0.680	101	0.664	98
Rec. media <sup>a</sup> (%)	<b>104 (34)</b>		<b>85 (10)</b>		Rec. media <sup>a</sup> (%)	<b>109 (35)</b>		<b>97 (11)</b>	
REP <sup>b</sup> (%)	<b>20</b>		<b>23</b>		REP <sup>b</sup> (%)	<b>17</b>		<b>9</b>	

<sup>a</sup>Recuperación media. Los valores entre paréntesis corresponden a las desviaciones estándar de las recuperaciones de las siete muestras de orina.

<sup>b</sup>REP (%): Error relativo de predicción.

A la vista de los resultados, podemos concluir que con ambos métodos se obtienen resultados adecuados para ambos analitos. En el caso del AF los errores de predicción son similares con ambos métodos, aunque las desviaciones en la recuperación son superiores al aplicar N-PLS. Para el MTX, tanto el error de predicción como la desviación de las recuperaciones son mayores al aplicar N-PLS.

En este caso en particular, podemos decir que ambos métodos muestran una capacidad predictiva similar y todas las predicciones parecen razonables para este tipo de muestras, teniendo en cuenta la complejidad de la orina humana.

#### **IV.6. EVALUACIÓN DE UNFOLDED-PLS ACOPLADO CON TRILINEALIZACIÓN RESIDUAL PARA LA RESOLUCIÓN DE LA MEZCLA BINARIA DE ÁCIDO FÓLICO Y METOTREXATO EN MUESTRAS DE SUERO**

En el apartado anterior, comprobamos que la mezcla de ácido fólico y metotrexato tan sólo se resuelve satisfactoriamente cuando se utilizan métodos de calibración multivariante de tercer orden. Finalmente, la resolución en muestras de orina fue posible empleando los métodos de calibración PARAFAC y N-PLS, no encontrando diferencias significativas entre ambos, en este caso en particular. Sin embargo, la aplicación de estos métodos en muestras de suero, que nos proporciona una matriz más compleja que la orina, no nos proporcionó predicciones adecuadas en ningún caso.

Cuando aplicamos N-PLS y PARAFAC a la resolución de esta mezcla en muestras de suero, se obtuvieron valores de los errores relativos de predicción mayores al 30 %, mientras que en muestras sintéticas estos valores se encontraban entre el 4 y 8 % y en muestras de orina, entre el 9 y 23 % [55].

En este apartado, se propone la resolución de esta mezcla en suero y, para ello, empleamos el método de calibración multivariante de tercer orden, U-PLS, combinado con un procedimiento propuesto recientemente, denominado trilinealización residual, RTL. Además, esta es la primera vez donde el algoritmo U-PLS/RTL demuestra proporcionar mejores resultados que PARAFAC o N-PLS en un problema biológico real.

#### **IV.6.1. *Determinación de AF y MTX en muestras de suero***

En este apartado, el método propuesto, se aplica a muestras de suero, siendo esta matriz más compleja que la de orina. Además, debido al efecto de filtro interno que se presenta con el suero, ni PARAFAC ni N-PLS nos proporcionaron resultados adecuados en las predicciones de estas muestras. Debido a esto, decidimos emplear un nuevo procedimiento, U-PLS acoplado a RTL, que ha demostrado ser útil en situaciones similares, para datos de tres vías [49, 50].

En la Figura IV.41 se muestra la evolución de las EEMs correspondiente a una muestra que contiene ácido fólico y metotrexato en presencia de permanganato potásico y, podemos observar, como aumenta la intensidad de fluorescencia de los analitos con el tiempo.



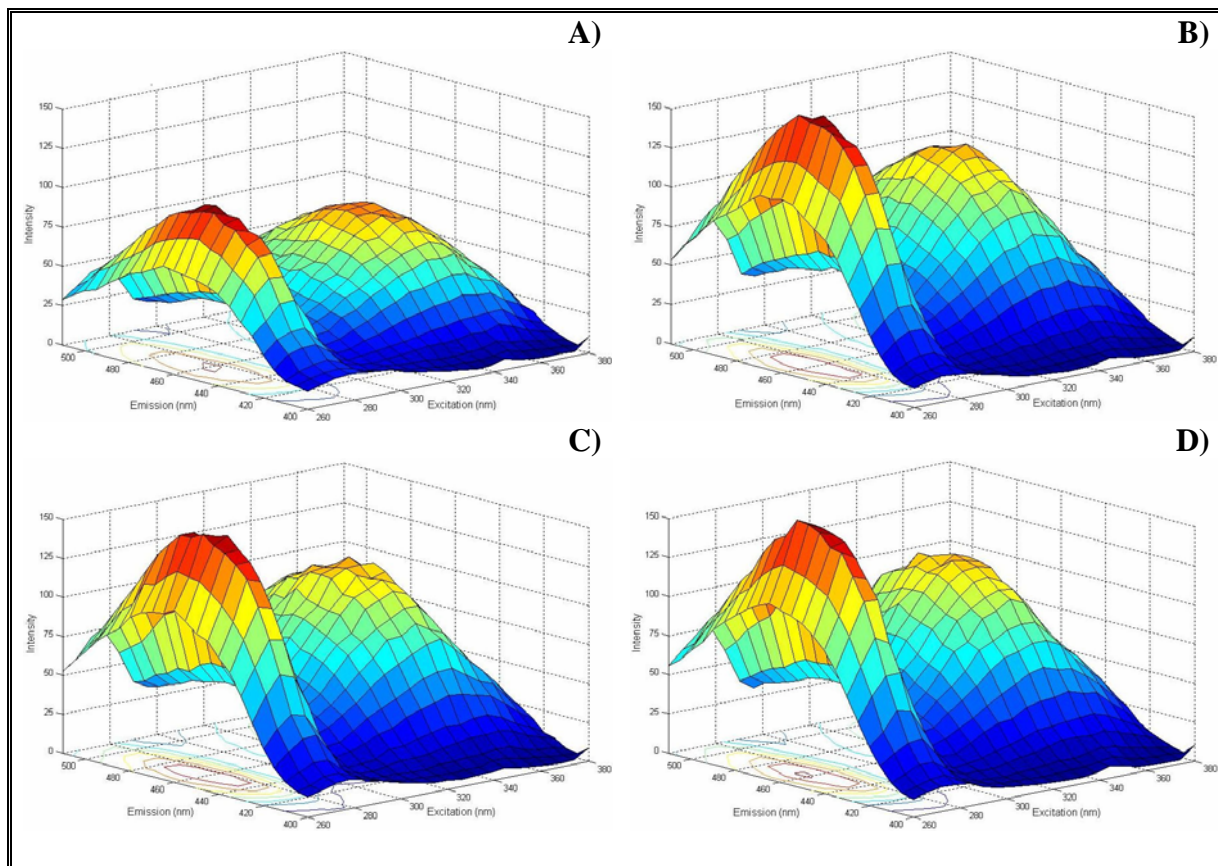


Figura IV.41. Matrices de excitación-emisión (EEMs) de una disolución acuosa (pH 3.4) que contiene  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  de AF y  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  de MTX, en función del tiempo de oxidación con permanganato potásico  $1.4 \times 10^{-4} \text{ M}$ . Los tiempos seleccionados para representar la evolución cinética de las EEMs fueron (en min): (A) 0, (B) 2.1, (C) 4.2 y (D) 6.3.

Teniendo en cuenta los resultados mostrados en los apartados anteriores, se registraron las EEM con el tiempo y, para realizar la calibración y predicción de las muestras, se emplearon los intervalos recogidos en la Tabla IV.13. Los métodos de calibración investigados fueron N-PLS, PARAFAC y U-PLS/RTL.

En la Figura IV.42 se muestra la composición de las muestras de calibración (Tabla IV.3) y de las muestras de suero, contaminadas con concentraciones aleatorias de los analitos, diferentes a las empleadas en la calibración, pero dentro del mismo intervalo. En la Tabla IV.18 se muestran las concentraciones de AF y MTX en las muestras de suero.

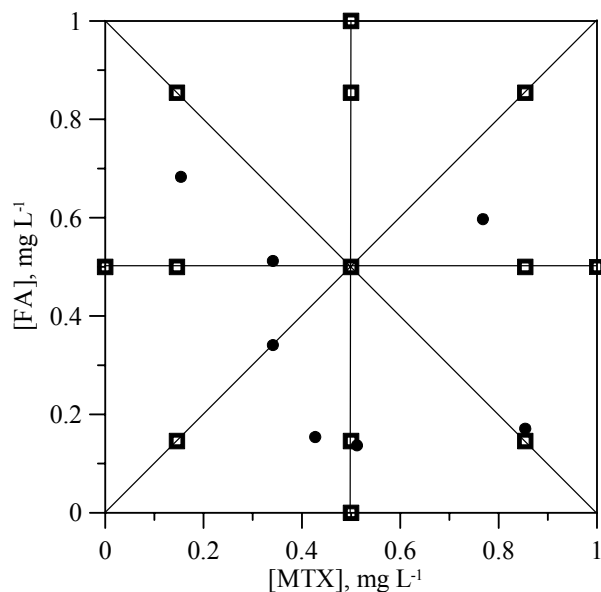


Figura IV.42. Diseño experimental empleado para la composición de las mezclas de AF y MTX en las muestras de calibración ( $\square$ ) y las muestras de suero ( $\bullet$ ).

En primer lugar, se realizaron distintos ensayos sometiendo al suero a distintas diluciones, de forma que las concentraciones finales de los analitos quedasen comprendidas en los rangos de la calibración ( $0-1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

Se operó del siguiente modo:

1. Tomar  $100 \mu\text{L}$  de suero y centrifugar durante 5 minutos.
2. Tomar  $10 \mu\text{L}$  del sobrenadante, que llevamos a la cubeta de medida del espectrofluorímetro y contaminamos con los analitos de interés.
3. Dejar transcurrir 30 minutos para favorecer las posibles interacciones entre los analitos y la matriz de suero.
4. Añadir  $1 \text{ mL}$  de disolución reguladora ácido cloroacético/cloroacetato sódico  $0.12 \text{ M}$ ,  $1 \text{ mL}$  de permanganato potásico  $4.2 \times 10^{-4} \text{ M}$  y diluir con agua destilada hasta  $3 \text{ mL}$ .

Siguiendo este procedimiento y teniendo en cuenta el rango de calibración realizado, se determinará AF y MTX hasta una concentración de  $300 \text{ mg L}^{-1}$ , que está dentro de los niveles encontrados en suero para pacientes bajo tratamiento con AF y MTX [56, 57].

Como ya se ha dicho en apartados anteriores, en las muestras acuosas el número de factores óptimo resultó ser igual a 2, mientras que en las muestras de suero enriquecidas este número es igual a 3 ó 4, lo que pone de manifiesto la presencia de interferencias en estas muestras. Como ya hemos indicado, cuando aplicamos PARAFAC o N-PLS para resolver esta mezcla en suero, no obtenemos resultados satisfactorios, siendo los valores de los errores relativos de predicción mayores al 30 %, lo que hacía inviable la determinación de los analitos en muestras de suero.

Cuando se analizaron los datos de las muestras de calibración y del conjunto de validación empleando U-PLS/RTL, se encontró un número óptimo de factores igual a 2 para cada analito, empleando el método de validación cruzada y siguiendo el criterio de Haaland y Thomas. Sin embargo, cuando se aplicó el procedimiento RTL al analizar las muestras de suero, fue necesario considerar 2 componentes adicionales para modelar las interferencias del suero. En la Figura IV.43 se muestra la variación de los residuos de predicción ( $s_u$ ) en función del número de interferentes ( $N_{\text{int}}$ ).

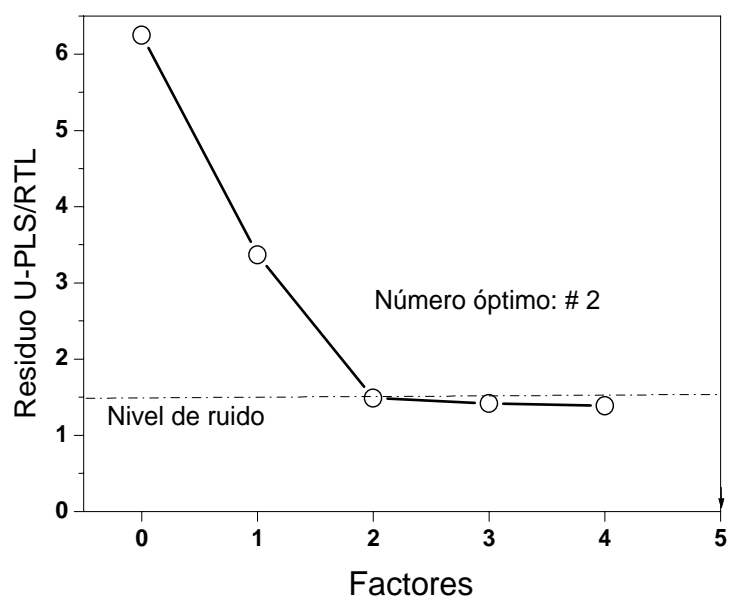


Figura IV.43. Representación de los residuos de predicción ( $s_u$ ) en función del número de interferentes ( $N_{int}$ ) para la muestra de suero 2, que contiene  $0.34 \text{ mg mL}^{-1}$  de AF y  $0.34 \text{ mg mL}^{-1}$  de MTX. El nivel de ruido en este sistema es de 1.5 unidades relativas de fluorescencia (---).

Una vez optimizado el número de factores se procedió al análisis de las muestras de suero enriquecidas y las recuperaciones obtenidas al aplicar U-PLS/RTL se muestran en la Tabla IV.18.

Tabla IV.18. Recuperaciones obtenidas al aplicar U-PLS/RTL a muestras de suero.

AF			MTX		
Puesto ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Predicho ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Rec. (%)	Puesto ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Predicho ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Rec. (%)
0.51	0.56	110	0.34	0.30	88
0.34	0.33	97	0.34	0.36	106
0.68	0.52	76	0.15	0.18	120
0.00	-	-	0.96	1.10	115
0.99	0.86	87	0.00	-	-
0.43	0.45	81	0.84	0.88	105
0.68	0.71	104	0.71	0.67	94
Rec. media (%)		<b>93 (13)</b>	Rec. media (%)		<b>105 (12)</b>
REP (%)		<b>12</b>	REP (%)		<b>11</b>

A la vista de los resultados obtenidos, podemos decir que todas las predicciones parecen razonables para este tipo de muestras, teniendo en cuenta la complejidad del suero humano. Además, se aplicó el test de la elipse, EJCR [51, 52], para comparar los valores de concentración teóricos con los predichos por U-PLS/RTL, para cada analito, Figura IV.44. En ambos casos el punto teórico (1,0) está dentro de las elipses, lo que indica que no difiere de los valores de pendiente y ordenada en el origen calculados, o lo que es lo mismo, que no hay diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones teóricas y las predichas, para un nivel de confianza del 95 %. Además, del tamaño de las elipses podemos concluir que U-PLS/RTL nos proporciona resultados más precisos en el caso de AF.

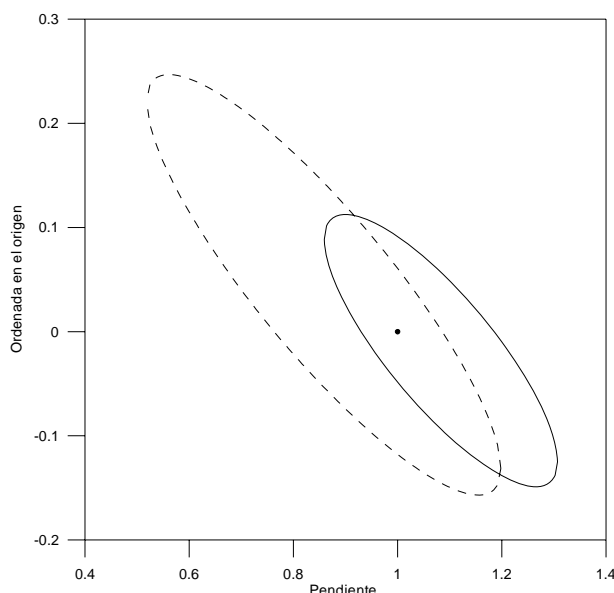


Figura IV.44. EJCR (95 % de confianza) para la pendiente y la ordenada en el origen de las regresiones de la concentración teórica frente a la predicha de AF (—) y MTX (- - -) empleando U-PLS/RTL en muestras de suero contaminadas.

La mejora de los resultados obtenidos, al aplicar U-PLS/RTL frente a los modelos clásicos PARAFAC y N-PLS, puede deberse respecto a PARAFAC, al hecho de que U-PLS modela mejor comportamientos donde hay interacciones entre los analitos y la matriz, que originan desviaciones de la trilinealidad. Mientras que, respecto a N-PLS, la mejora se debe a que este último no presenta la ventaja de segundo orden.

Se han encontrado resultados similares al analizar muestras biológicas de gran complejidad, donde la matriz presenta interferentes y/o donde se dan fenómenos de filtro interno, empleando datos de segundo orden [49, 50] y de tercer orden [58].

## IV.7. CONCLUSIONES

El ácido fólico y el metotrexato, en presencia de  $\text{KMnO}_4$ , originan productos de oxidación que presentan una elevada fluorescencia, permitiendo así la determinación indirecta de ambos analitos.

Para resolver esta mezcla, se han empleado distintos métodos de calibración multivariante de primer, segundo y tercer orden y, debido a su gran complejidad, ni los métodos de calibración multivariante de primer ni de segundo orden resuelven satisfactoriamente el problema planteado.

Teóricamente, al introducir una dimensión adicional al conjunto de datos de tres vías, se obtiene un incremento de la habilidad predictiva del modelo. Esto ha sido comprobado en este trabajo y, tan sólo empleando calibración multivariante de tercer orden, se logra resolver satisfactoriamente el problema, en muestras de orina, utilizando los métodos PARAFAC y N-PLS.

El método de calibración U-PLS, combinado con el procedimiento RTL, nos proporciona una mayor flexibilidad frente a comportamientos que se apartan de la linealidad, así como la ventaja de segundo orden.

El uso de datos de cuatro vías, explotando la información contenida en las EEM, en combinación con métodos cinéticos, es una valiosa herramienta para el análisis multicomponente en muestras complejas.

El seguimiento de la cinética de formación de los productos fluorescentes, mediante la reacción de oxidación con permanganato potásico, provee un orden adicional de selectividad para determinar los analitos de interés.

La calibración con U-PLS, método que incluye variables latentes adicionales en el modelo, en combinación con RTL, que aporta la ventaja de segundo orden a esta

metodología, mejora considerablemente los resultados analíticos permitiendo la determinación de ácido fólico y metotrexato en muestras de suero.



## IV.8. BIBLIOGRAFÍA

---

1. Morgan S.L., Baggott J.E., Lee J.Y., Alarcón G.S., *J. Rheumatol.*, 25 (1998) 441.
2. El-Hady D. Abd, El-Maali N. Abo, Gotti R., Bertucci C., Manzini F., Andrisano V., *J Pharm Biomed Anal*, 37 (2005) 9195.
3. <http://www.consumaseguridad.com/web/es/investigacion/2003/06/03/6711.php>
4. [http://bvs.sld.cu/revistas/hih/vol13\\_2\\_97/hih01297.htm](http://bvs.sld.cu/revistas/hih/vol13_2_97/hih01297.htm)
5. Cooper B.A., Rosenblat D.S., Whithead V.M., *Megaloblastic anemia en hematology of infance and childhood.*, 4 ed. Philadelphia: WB Saunders, 1 (1993) 354.
6. Espinós D., Villegas A.M., *Bioquímica y metabolismo de la vitamina B12 y el ácido fólico*. En: Enciclopedia Iberoamericana de Hematología. Salamanca: Editorial Universidad, 199; 253.
7. Brater, J. Clark, *Farmacología médica*, 13ª edición.
8. Szczepaniak W., Ren M., *Electroanalysis*, 6 (1994) 505.
9. Shane B., *Folate Chemistry and metabolism*. En: *Folate in health and disease*. Bailey, LB, ed. Marcel Dekker Inc. Nueva York, EEUU. (1995) 1.
10. Varela Moreiras G., Selhub J., *J. Nutr* 122 (1992) 986.
11. 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. (1993) 233.
12. El Gizawy S.M., Ahmed A.N., El-Rabbat A.N., *Anal Lett* 24 (1991) 1173.
13. Osseyi E.S., Wehling R.L., Albrecht J.A., *J Chromatogr A*, 826 (1998) 235.
14. Akhtar M.J., Khan M.A., Ahmad I., *J Pharm Biomed Anal*, 16 (1997) 95.
15. Albala Hurtado S., Veciana Nogues M.T., Izquierdo Pulido M., Marine Font A., *J Chromatogr A*, 778 (1997) 247.
16. Holt D., Wheling R.L., Zeece M.G., *J Chromatogr*, 449 (1988) 271.
17. Leeming R.J., Pollock A., Melville J.L., Hamon C.G.B., *Metab Clin Lab*, 39 (1990) 902.
18. Konings E.J.M., *JAOAC Int* 82 (1999) 119.
19. Ichinose N., Tsuneyoshi T., Kato M., Suzuki T., Ikeda S., *Fresenius' J Anal Chem*, 346 (1993) 841.

- 
20. Villamil M.J.F., Mairanda Ordieres A.J., Costa Garcia A., Tuñon Blanco P., *Anal Chim Acta*, 273 (1993) 377.
  21. White D.R., Lee H.S., Kruger R.E., *J Agric Food Chem*, 39 (1991) 714.
  22. Szczepaniak W., Ren M., *Electroanalysis*, 6 (1994) 505.
  23. Zhang J.R., Ying Z.G., Zhang Z.X., *Fenxi Shiyanshi*, 12 (1993) 1.
  24. Buhl F., Hachula U., *Anal. Chem.*, 36 (1991), 27.
  25. Cruces Blanco C., Segura Carretero A., Fernández Gutiérrez A., Román Ceba M., *Anal. Lett.*, 27 (1994) 1339.
  26. Liu X., Huang H.G., *Fenxi Huaxue*, 28 (2000) 1406.
  27. Lapa R.A.S., Lima J.L.F.C., Reis B.F., Santos J.L.M., Zagatto E.A.G., *Anal. Chim. Acta*, 351 (1997) 223.
  28. Cao Z.G., Ye X.H., Ding J.N., *Fenxi. Ceshi. Xuebao.* 18 (1999) 57.
  29. Bleyer W.A., *Cáncer*, 41 (1978) 36.
  30. Goldman I.D., Matherly L.H., *Pharmacol. Ther.*, 28 (1985) 77.
  31. Kamen B.A., *Folic acid antagonist*. In: Powis G, Prough RA, eds.; Metabolism and action of anti-cáncer drugs. Philadelphia: Taylor and Francis; (1987) 141.
  32. Ackland S.P., Schilsky R.L., *J. Clin. Oncol.*, 5 (1987) 2017.
  33. Covey, J.M., *Life Sci.*, 26 (1980) 665.
  34. Kris, M.G., Kinaham, J.J., Gralla, R.J., *Cancer Res.*, 48 (1988) 5573.
  35. Gandhi, R., Khopade, A.J. y Jain, N.K., *Indian Drugs*, 34 (1997) 455.
  36. Sastry, C.S.P. y Lingeswara-Rao, J.S.V.M.; *Anal. Lett.*, 29 (1996) 1763.
  37. Beck O., Seideman P., Wennberg M., Peterson C., *Ther Drug Monit*, 13 (1991) 528.
  38. Mader R.M., Rizouski B., Steger G.G., Rainer H., *J Chromatogr B:Biomedical Sciences and Applications*, 613 (1993) 311.
  39. Lu G.W., Jun H.W., *J Liquid Chromatogr*, 18 (1995) 155.
  40. Cataldi T.R.I., Guerrieri A., Palmisano F., Zambonin P.G., *Analyst*, 113 (1088) 869.
  41. Miranda A.J., Costa A., Arribas S., Tuñon P., *An. Quim., Ser. B.*, 83 (1987) 342.
  42. Mrestani Y., Neubert R.H.H., *Electrophoresis*, 19 (1988) 3022.
  43. Roach M.C., Gozel P., Zare R.N., *J. Chromatogr.*, 426 (1998) 129.

44. Sczesny F., Hempel G., Boss J., Blaschke G., *J. Chromatogr. B., Biomed. Appl.*, 718 (1998) 177.
45. Espinosa Mansilla A., Durán Merás I., Zamora Madera A., Pedano L., Ferreyra C., *J Pharm Biomed Anal*, 29 (2002) 851.
46. Wittle E.L., O'Dell B.L., Vandenbelt J.M., Pfiffner J.J., *J Am Chem Soc* 69 (1947) 1786.
47. Haaland D.M., Thomas E.V., *Anal. Chem.*, 60 (1998) 1193.
48. Haaland D.M., Thomas E.V., *Anal. Chem.*, 60 (1988) 1202.
49. Culzoni M.J., Goicoechea H.C., Pagani A.P., Cabezon M.A., Olivieri A.C., *Analyst*, 131 (2006) 718.
50. Piccirilli Gisela N., Escandar Graciela M., *Analyst*, 131 (2006) 1012.
51. Riu, J., Rius, F. X., *Trends in Anal. Chem.*, 16 (1997) 211.
52. del Río, F. J., Riu, J., Rius, F. X., *Anal. Chim. Acta*, 446 (2001) 49.
53. Rubino F.M., *J Chromatogr B*, 764 (2001) 217.
54. Crom W.R., Evans W.E. (1992) Metotrexate. In: Evans WE, Schentang JJ, jsko WJ (eds) Applied pharmacokinetics. Principles of therapeutic drug monitoring. 3<sup>rd</sup> edn. Applied therapeutics. Vancouver.
55. Muñoz de la Peña A., Durán Merás I., Jiménez Girón A., *Anal. Bioanal. Chem.*, 385 (2006) 1289.
56. Espinosa Mansilla A., Durán Merás I., Rodríguez Gómez M. J., Muñoz de la Peña A., Salinas F., *Talanta* 58 (2002) 255.
57. Sarah L. Morgan, Jeannette Y. Lee, Graciela S. Alarcon, *Annals of Internal Medicine*, 124 (1996) 74.
58. Bohoyo Gil D., Muñoz de la Peña A., Arancibia J. A., Escandar G. M., Olivieri A. C., *Anal. Chem.*, 78 (2006) 8051.



**Capítulo V**

**DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE ÁCIDO FÓLICO Y SUS  
METABOLITOS, ÁCIDO 5-METIL TETRAHIDROFÓLICO Y  
ÁCIDO TETRAHIDROFÓLICO, EN SUERO**



## V.1. INTRODUCCIÓN

En este capítulo se han estudiado las propiedades de fluorescencia del ácido fólico (AF) y dos de sus metabolitos más importantes, el ácido 5-metil tetrahidrofólico (5M) y el ácido tetrahidrofólico (THF).

En la Figura V.1 se muestran las estructuras de estos tres compuestos. La molécula de ácido fólico se puede considerar formada por la unión de una estructura pirazino pirimidínica (pteridina), una molécula de ácido *p*-aminobenzoico y una molécula de ácido glutámico. Las moléculas de THF y 5M son similares al ácido fólico en cuanto a la presencia de estos dos últimos ácidos, pero la estructura aromática presente, corresponde a un solo anillo de tipo pirimidina, ya que el segundo anillo, no aromático, corresponde a un anillo tetrahidropirazínico, sustituido en el C5 en el caso del 5M.

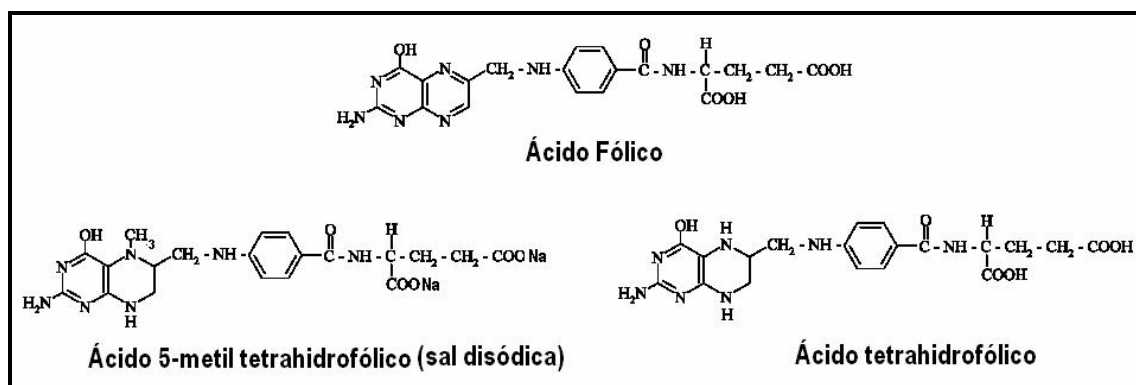


Figura V.1. Estructuras del AF, 5M y THF.

Basándonos en la determinación indirecta de estos analitos a partir de los fotoproductos generados con irradiación UV, se propone un método para la determinación simultánea de AF y su metabolito 5M, empleando métodos de calibración multivariante de segundo orden. Asimismo, se propone un método para la determinación de la mezcla ternaria de AF y sus metabolitos 5M y THF, empleando calibración multivariante de tercer orden.

### ***V.1.1. Características del AF y sus metabolitos THF y 5M***

Como estudiamos en el Capítulo IV de la presente memoria, el ácido fólico es una vitamina hidrosoluble del complejo B, que se administra por vía oral y parenteral. Esta vitamina se encuentra en una gran variedad de alimentos incluyendo el hígado, la levadura y los vegetales verdes.

Los folatos, sustancias derivadas del ácido fólico, presentan efectos protectores demostrados científicamente en la prevención de enfermedades y malformaciones de carácter hematológico, neurológico y anatómico. Hallazgos recientes han ampliado las virtudes del ácido fólico, que también actúa preventivamente en patología cardiovascular y distintas formas de cáncer [1].

En la naturaleza existen más de 100 folatos derivados del ácido fólico (que es bioquímicamente inactivo), de los cuales tan sólo unos pocos son lo suficientemente estables como para aislarlos y analizarlos químicamente. Entre ellos, dos de los más relevantes son, el ácido 5-metil tetrahidrofólico y el ácido tetrahidrofólico [2]. Estos compuestos y otros similares son esenciales en la síntesis de ácidos nucleicos derivados de purina y timidina, necesarias en la síntesis y reparación del ADN. También participan en la interconversión y metabolismo de algunos aminoácidos, como la histidina a glutámico y la serina a glicina y en la generación de S-adenosilmetionina, un donador de grupos metilo que también metila el ADN. Su deficiencia puede relacionarse con carcinogénesis, bien por la síntesis o reparación de ADN dañado, o causando hipometilación del ADN, una posible causa de cáncer [3]. Los derivados del ácido fólico son transportados al interior de las células, donde participan en los procesos antes indicados, así como en la síntesis de proteínas [4].



### ***V.1.2. Fluorescencia inducida fotoquímicamente a temperatura ambiente***

La fluorescencia molecular es un potente método de análisis, dada la alta sensibilidad y selectividad que posee. Sin embargo, muchos compuestos presentan una nula o muy débil fluorescencia, lo que hace que su determinación fluorimétrica sea inviable o de muy baja sensibilidad.

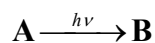
A veces, la radiación UV produce la fotólisis o reorganizaciones estructurales del analito, originándose cambios en su fluorescencia nativa o, incluso, originándose fotoproductos que son altamente fluorescentes. Este fenómeno ha dado lugar a que se haya propuesto el uso de reacciones fotoquímicas para aumentar la sensibilidad y selectividad de la detección fluorimétrica. Este método se denomina “fluorescencia inducida fotoquímicamente a temperatura ambiente” (Room Temperature Photoinduced Fluorescence), “RTPF” o simplemente “fluorescencia fotoinducida” (Photoinduced Fluorescence), “PIF”.

Cuando el fotoproducto formado es menos fluorescente que el analito, la señal medida es la disminución de la fluorescencia. No obstante, en la mayoría de los compuestos, la reacción fotoquímica conlleva un aumento del coeficiente de absorción y del rendimiento cuántico de fluorescencia, con relación a los del analito de partida. Por tanto, el aumento de la señal de fluorescencia del fotoproducto origina un aumento de la sensibilidad de la detección fluorimétrica.

#### ➤ *Fundamento teórico*

Los aspectos teóricos de la PIF, que tratan fundamentalmente de las leyes de la cinética fotoquímica involucrada y de la relación entre la concentración inicial del analito y la intensidad de fluorescencia del fotoproducto, han sido estudiados por pocos autores [5-7].

Supongamos un analito A, que por acción de la radiación electromagnética se transforma en un fotoproducto B:



En disolución diluida, si la absorbancia es inferior a  $10^{-2}$ , la velocidad de fotorreacción del analito A viene dada por la expresión:

$$v = -\frac{dC_A}{dt} = \frac{dC_B}{dt} = \sum_{\lambda_p} \phi_{\lambda_p} \cdot I_{0,\lambda_p} \cdot a_{\lambda_p} \cdot b \cdot C_A \quad (\text{ec. V.1.})$$

donde el sumatorio afecta a todas aquellas longitudes de onda incidentes que producen fotorreacción, siendo las otras variables:

$\Phi_{\lambda_p}$ : rendimiento cuántico de la fotorreacción a cada  $\lambda$ .

$I_{0,\lambda_p}$ : intensidad incidente a cada  $\lambda$ .

$a_{\lambda_p}$ :  $2.303 \times \epsilon_A$ , dónde  $\epsilon_A$  es la absorptividad molar a cada  $\lambda$ .

$b$ : camino óptico.

$C_A$ : concentración del analito.

$C_B$ : concentración del fotoproducto.

Si se admite que  $I_{0,\lambda_p}$  es constante y mucho mayor que  $C_A$ , la expresión ec. V.1. se puede transformar en la ecuación de primer orden ec. V.2:

$$(C_A)_t = (C_A)_0 \cdot 10^{\left( -\sum_{\lambda_p} \phi_{\lambda_p} \cdot I_{0,\lambda_p} \cdot a_{\lambda_p} \cdot b \cdot t \right)} \quad (\text{ec. V.2.})$$

donde  $(C_A)_t$  es la concentración del analito a un tiempo t y  $(C_A)_0$  su concentración inicial.

En una reacción fotoquímica simple, como es la transformación de una sustancia A, en el fotoproducto, B, transcurrido un tiempo t, la concentración de éste,  $(C_B)_t$ , será:

$$(C_B)_t = (C_A)_0 - (C_A)_t \quad (\text{ec. V.3.})$$

y teniendo en cuenta la ecuación V.2, se llega a la expresión:

$$\left(C_B\right)_t = \left(C_A\right)_0 \left[ 1 - 10^{\left(-\sum_{\lambda_p} \phi_{\lambda_p} \cdot I_{0,\lambda_p} \cdot a_{\lambda_p} \cdot b \cdot t\right)} \right] \quad (\text{ec. V.4.})$$

De modo que la intensidad de fluorescencia del fotoproducto,  $I_{FB}$ , será:

$$I_{FB} = f(\theta)g(\lambda') \sum_{\lambda_{FB}} \phi_{FB} \cdot I_{0,\lambda_{FB}} \cdot a_{\lambda_{FB}} \cdot b \cdot C_B \quad (\text{ec. V.5.})$$

donde  $f(\theta)$  es el factor geométrico y  $g(\lambda')$  la respuesta del detector a la longitud de onda analítica. Las variables restantes tienen el mismo significado que en la expresión ec. V.1, pero referidas al fotoproducto.

Si la intensidad de la radiación incidente es constante, la intensidad de fluorescencia del fotoproducto sólo depende de su concentración,  $C_B$ , y las variaciones de  $I_{FB}$ , corresponden a las variaciones de la concentración del fotoproducto,  $C_B$ . Si se definen:

$$K = \sum_{\lambda_{FB}} \phi_{FB} \cdot I_{0,\lambda_{FB}} \cdot a_{\lambda_{FB}} \cdot b \quad (\text{ec. V.6.})$$

$$\chi = f(\theta)g(\lambda') \cdot K \quad (\text{ec. V.7.})$$

La señal de fluorescencia del fotoproducto será:

$$\left(I_{FB}\right)_t = \chi \left(C_B\right)_t = \chi \left(C_A\right)_0 \left[ 1 - 10^{-kt} \right] \quad (\text{ec. V.8.})$$

Empleando el mismo tiempo para cada medida de fluorescencia, al representar la señal de fluorescencia del fotoproducto,  $I_{FB}$ , frente a la concentración de analito inicial  $(C_A)_0$ , obtendremos una línea recta. En consecuencia, si la fotorreacción de un analito no fluorescente o débilmente fluorescente, origina un fotoproducto fluorescente, la PIF permite su determinación, sobre todo cuando éste presenta un alto rendimiento cuántico de fluorescencia  $\Phi_{\lambda_{FB}}$ .

➤ *Reacciones fotoinducidas*

El número de reacciones inducidas fotoquímicamente en las que pueden producirse variaciones de fluorescencia es amplio. No obstante, para que una de estas reacciones sea desde el punto de vista analítico interesante, debe reunir una serie de requisitos que raramente se cumplen simultáneamente, por lo que se tratará de encontrar las condiciones para obtener los resultados óptimos para cada analito.

- El analito debe absorber fuertemente en el UV para iniciar la reacción fotoquímica.
- La radiación absorbida debe ser de una longitud de onda que no sea absorbida significativamente por el/los fotoproducto/s.
- Los fotoproductos deberán de ser estables química y térmicamente, al menos el tiempo suficiente para realizar las medidas.
- El proceso de fotoconversión deberá ser muy eficiente y el rendimiento cuántico de fluorescencia del fotoproducto deberá ser mayor que el del analito, aumentando su rigidez estructural o la aromaticidad de los fotoproductos.

Entre las reacciones que pueden producirse por irradiación UV, las que más aplicación encuentran en los métodos de análisis basados en fluorescencia inducida son, reacciones de fotociclación, fotoisomerización, fotólisis, fotorreducción y fotooxidación.

Una gran parte de las primeras conducen a la formación de fenantreno, antraceno o derivados [8-12], mientras que las de fotoisomerización [13] conducen a derivados de naftaleno.

Las reacciones de fotólisis son numerosas, encontrándose en complejos [14] y en varios tipos de pesticidas [15, 16].

Mediante reacciones de fotorreducción, es posible la determinación de quinonas no fluorescentes como la vitamina K [17, 18] o herbicidas derivados de dinitroanilinas

no fluorescentes [19]. Por último, se ha empleado una reacción de fotooxidación para la determinación de varias fenotiazinas [20, 21] y de compuestos donores de átomos de hidrógeno como alcoholes, aldehídos y éteres [22].

➤ *Instrumentación*

En un equipo para medidas de fluorescencia fotoinducida, el componente diferenciador de un espectrofluorímetro clásico es el fotorreactor, siendo ésta la parte fundamental del sistema.

En la actualidad no existen comercializados instrumentos para PIF, como tales, por lo que se han diseñado diferentes fotorreactores, con el paso de los años, por los propios investigadores.

Los primeros fotorreactores estaban constituidos por lámparas de mercurio de media o alta presión, refrigeradas por agua, o bien por lámparas de xenon o xenon-Hg refrigeradas por aire. En todos los casos el analito circulaba por el interior de un capilar de cuarzo enrollado sobre la lámpara que permitía, dada su buena transparencia a la radiación UV, la irradiación del analito. Uno de los primeros diseños de fotorreactor es el que se esquematiza en la Figura V.2.

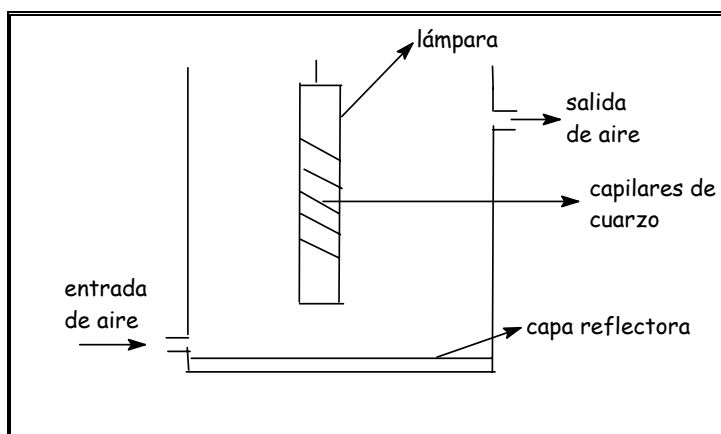


Figura V.2. Esquema de uno de los primeros diseños de fotorreactores.

La fragilidad y dificultad de manejo del cuarzo llevó a Scholten, en 1980, a proponer el teflón (politetrafluoroetileno, PTFE) como material para los capilares. Su transparencia a la radiación UV es debida a múltiples procesos de reflexión que hacen que la radiación pase a través de los poros del polímero. Se encuentra comercializado en diferentes diámetros y su costo es bajo. Finalmente, el cuarzo fue sustituido por el teflón y, en 1983, Lang diseña el primer fotorreactor con capilares de este material. Éstos están enrollados sobre un cilindro de cuarzo, en cuyo interior se encuentra la lámpara que se mantiene a 25 °C, refrigerando con agua.

Uno de los inconvenientes del uso del teflón estriba en que se liberan cantidades significativas de  $F^-$  y  $H^+$  cuando la temperatura se acerca a los 50 °C. La liberación de  $F^-$  es función del tiempo de residencia del analito en el capilar y puede dar lugar a un aumento de la señal de fondo y a una variación de la fluorescencia del compuesto en estudio. Para minimizar el efecto de la temperatura y simplificar su construcción, se propuso el uso de las lámparas de baja presión.

En 1983, Arakawa [23] propone el uso de un fotorreactor en el que se emplea una lámpara de Hg de baja presión y concéntrico a ella un cilindro de cuarzo. Sobre él va enrollado el capilar de teflón por el que circula la disolución en estudio.

En este capítulo, se ha empleado una lámpara de Hg de alta presión para realizar los estudios previos y, posteriormente, se ha diseñado un montaje que permite la irradiación de forma continuada, en el que se ha acoplado un fotorreactor con lámpara de Xe a un espectrofluorímetro convencional. En este caso, la disolución se hace circular a través de un tubo de teflón que se encuentra enrollado a la lámpara.

➤ *Aplicaciones analíticas de la Fluorescencia Inducida Fotoquímicamente*

Debido a su gran versatilidad, la metodología PIF ha dado lugar a un elevado número de aplicaciones en diferentes campos. Se han realizado estudios PIF en medio estacionario (disolución), sobre soporte sólido (en modo discontinuo) y mediante acoplamiento con técnicas de flujo, como FIA y HPLC, que pueden clasificarse en

análisis de residuos de pesticidas, análisis farmacológico/clínico y, el resto de ellos, que pueden agruparse en aplicaciones generales.

Como breve reseña histórica, la Fluorescencia Inducida Fotoquímicamente fue utilizada por primera vez por Lukasiewicz y Fitzgeralds [24] para la determinación de DL-triptófano y derivados, dopamina y sulfato de quinina entre otros compuestos, mediante una reducción de su señal de fluorescencia tras ser irradiados a tiempo fijo con una lámpara UV.

- Medio estacionario

La metodología de trabajo empleada en medio estacionario consiste en irradiar el recipiente que contiene el analito (generalmente la cubeta de cuarzo donde se llevará a cabo la medida), con una lámpara UV de elevada potencia, generando de esta forma los fotoproductos fluorescentes, y registrando, posteriormente, la señal analítica.

Son muchas las familias de compuestos que se han estudiado mediante PIF. Entre ellas, podemos citar las fenotiazinas, que son compuestos usados para tratar trastornos mentales, nerviosos y emocionales [20, 25] y las sulfonamidas, empleadas en el tratamiento sistémico de infecciones bacterianas en humanos y animales [26, 27].

Otros compuestos de interés clínico y farmacológico que han sido analizados por PIF en medio estacionario son los antiinflamatorios: ácido flufenámico [28] y fenilbutazona [29] (en orina y fármacos), fitonadiona y menadiona en fármacos [17, 30], fleroxacina en orina [31], los antimaláricos clorquina [32] y primaquina [7], y los ansiolíticos lorazepan [33] y tiotixeno [34].

Con respecto al análisis de pesticidas en modo estacionario, son varias las familias que han sido determinadas en medio acuoso, orgánico o haciendo uso de medios organizados, como herbicidas de la familia de las nitroanilinas [35] o el insecticida imidacloprid [36].

- Soporte sólido

Las aplicaciones descritas en bibliografía empleando soporte sólido son más escasas. En el caso de los pesticidas, se llevan a cabo de forma discontinua, irradiando el analito y determinándolo a posteriori sobre el soporte sólido. Aaron y Fidanza proponen la determinación de diversos agentes antimaláricos, determinándolos directamente sobre el gel de sílice de las placas de cromatografía en capa fina [37, 38]. Poco después, estos mismos autores, describen la determinación de teofilina y clorquina sobre un papel de filtro [39].

- Acoplamiento HPLC-PIF

Fue propuesta inicialmente por Welling y *col.* [40] para la determinación del tranquilizante demoxepam y algunas fenotiazinas en suero y orina. El método consistía en la separación cromatográfica del analito del resto de la matriz, su posterior fotorreacción post-columna y, finalmente, detección fluorimétrica. Posteriormente, y siguiendo una metodología similar, han sido muchas las determinaciones que se han descrito.

En lo que respecta a los principios clínicos/farmacológicos, teniendo en cuenta el poder de separación de la cromatografía y la selectividad y sensibilidad que aporta la metodología PIF, las aplicaciones de este acoplamiento están desarrolladas en matrices complejas como en plasma/suero sanguíneo y orina. Del mismo modo, esta metodología también ha sido ampliamente utilizada en el campo de análisis de residuos de pesticidas en diversas matrices.



- Acoplamiento FIA-PIF

Las aplicaciones de la Fluorescencia Inducida Fotoquímicamente, a la determinación de analitos en sistema de flujo, son sensiblemente menores que en los casos anteriores. La primera descripción de un sistema de este tipo data de 1991, en la que Chen y *col.* [41, 42] determinan mediante PIF tres fenotiazinas (clorpromazina, prometazina y perfenazina) en fármacos.

Otras aplicaciones se describieron, a posteriori, para la determinación de compuestos de interés farmacológico y residuos de pesticidas.

Respecto a los analitos estudiados en este capítulo, tan solo se ha encontrado una referencia bibliográfica en la que se ha empleado la Fluorescencia Inducida Fotoquímicamente, acoplada a un sistema de flujo, para determinar ácido fólico en formulaciones farmacéuticas [43].



## Resultados y discusión



## V.2. ESTUDIOS FLUORIMÉTRICOS PREVIOS

Como explicamos en el apartado V.1, el objetivo de este capítulo es la determinación simultánea de estos analitos en muestras de suero, para lo que utilizaremos distintos métodos de calibración multivariante.

Tal como hemos comprobado en estudios previos, la fluorescencia nativa del ácido fólico es muy débil, como se puede observar en la Figura V.3. De sus dos metabolitos, el que presenta un mayor rendimiento cuántico es el 5M

En primer lugar, se realizaron una serie de ensayos encaminados a obtener la mayor sensibilidad para la determinación de estos analitos.

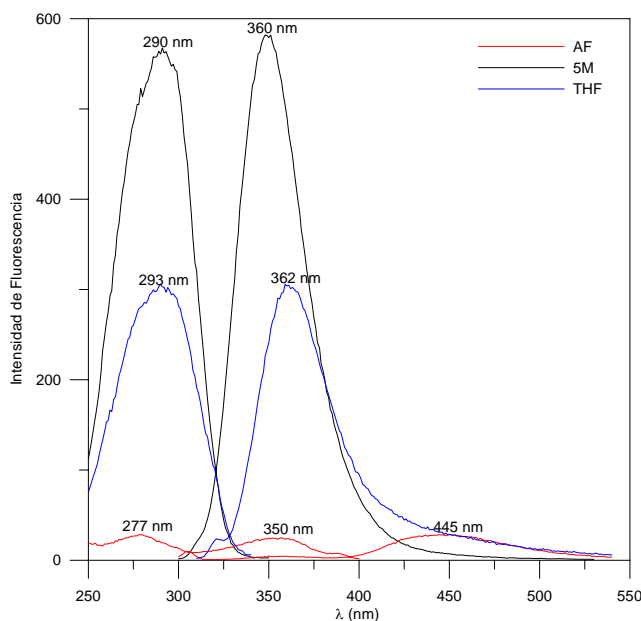


Figura V.3. Espectros de excitación y emisión de  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  de cada analito a temperatura ambiente. Tampón cloroacético/cloroacetato  $0.04 \text{ M}$ ,  $\text{pH } 4$ . Voltaje del fotomultiplicador =  $700 \text{ V}$ ; Rendijas monocromadores  $\text{ex/em} = 5/5 \text{ nm}$ ; Velocidad de barrido =  $10 \text{ nm/seg}$ .

Los espectros del ácido fólico presentan dos máximos de excitación a 277 y 350 nm y un máximo de emisión a 445 nm. El ácido 5-metil tetrahidrofólico presenta un máximo de excitación a 290 nm y un máximo de emisión a 360 nm y el ácido

tetrahidrofólico presenta un máximo de excitación a 293 nm y un máximo de emisión a 362 nm.

Como podemos observar en la Figura V.4, donde se representan los espectros anteriores normalizados, los espectros de estos tres productos presentan un elevado grado de solapamiento, sobre todo en el caso de los dos metabolitos, lo que dificulta su determinación cuando coexisten.

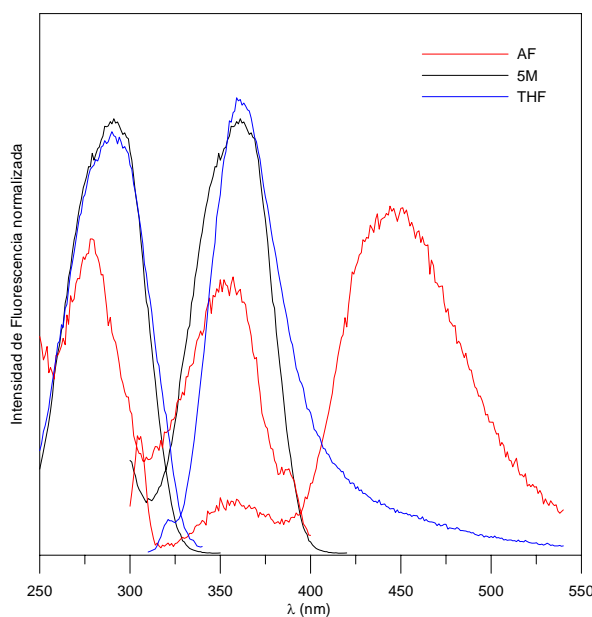


Figura V.4. Espectros normalizados de excitación y emisión de  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  de cada analito.

Según estudios previos [44, 45], el ácido fólico se oxida perdiendo probablemente la cadena unida a la estructura pteridínica en la posición 6, originando un producto pteridínico altamente fluorescente.

Con objeto de aumentar la fluorescencia y la diferenciación espectral de los analitos, se estudiaron diversos modos de reacción. Se estudió el efecto de la radiación UV, en presencia y ausencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , y la oxidación con  $\text{I}_2$ . Este último procedimiento no nos condujo a resultados satisfactorios, por lo que no haremos ninguna referencia en adelante.

➤ *Influencia de la acidez del medio*

**Ácido Fólico**

Se estudió la influencia de la acidez del medio en la fluorescencia del ácido fólico (AF) en agua. Para ello se preparó una disolución de concentración  $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$  de AF y  $0.1 \text{ M KCl}$ , a la que se le fue variando el pH mediante la adición de HCl o NaOH. En la Figura V.5 se recogen los espectros obtenidos a diferentes valores de pH, observándose como aumenta ligeramente la fluorescencia al disminuir la acidez del medio, obteniendo la mayor señal de fluorescencia en torno a pH 4, para posteriormente disminuir de nuevo en medio básico, donde a partir de pH 6, se produce un desplazamiento del máximo de excitación situado en  $350 \text{ nm}$ , localizándose en  $365 \text{ nm}$  y el situado a  $277 \text{ nm}$  se desliza a  $258 \text{ nm}$ . El máximo de emisión se desliza de  $445$  a  $450 \text{ nm}$ .

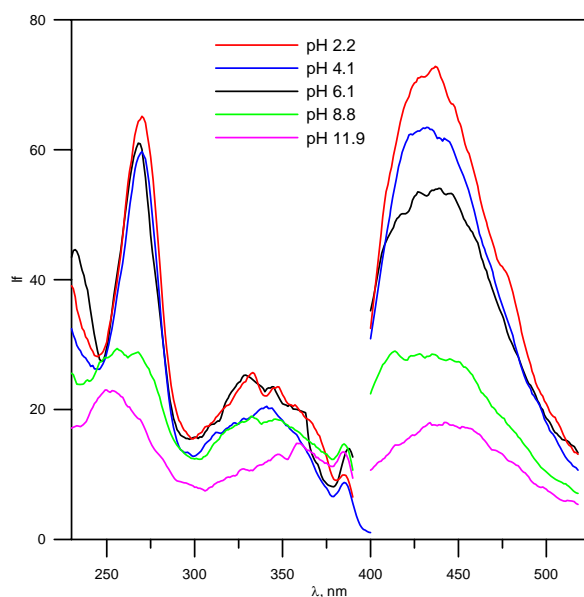


Figura V.5. Espectros de excitación y emisión de AF en función del pH.  $\lambda_{ex} = 277 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 445 \text{ nm}$ ; Voltaje del fotomultiplicador =  $800 \text{ V}$ ; Rendijas ex/em  $5/5 \text{ nm}$ ; Velocidad de barrido =  $10 \text{ nm/seg}$ ; Temperatura =  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ .  $[\text{AF}] = 0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$

## Ácido Tetrahidrofólico

Para estudiar la influencia de la acidez del medio en la fluorescencia del ácido tetrahidrofólico (THF) se operó del mismo modo, se preparó una disolución acuosa de  $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$  y  $0.1 \text{ M KCl}$ , a la que se le fue variando el pH mediante adición de HCl o NaOH. En la Figura V.6 se recogen los espectros obtenidos a diferentes pH.

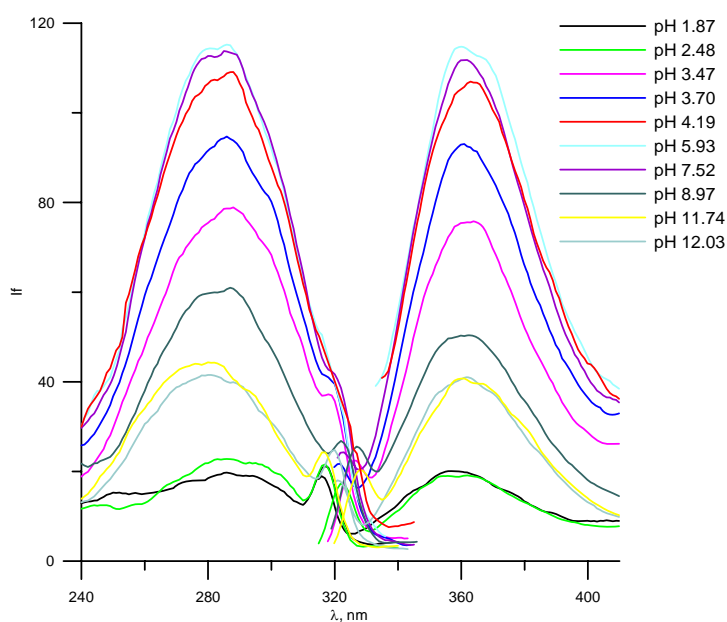


Figura V.6. Espectros de excitación y emisión del ácido THF en función del pH.  $\lambda_{ex} = 293 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 362 \text{ nm}$ ; Voltaje del fotomultiplicador =  $700 \text{ V}$ ; Rendijas ex/em =  $5/5 \text{ nm}$ ; Velocidad de barrido =  $10 \text{ nm/seg}$ ; Temperatura =  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ .  $[\text{THF}] = 0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$

Observamos como aumenta la fluorescencia al disminuir la acidez del medio, obteniendo la mayor señal de fluorescencia en torno a pH 6, para posteriormente disminuir de nuevo en medio básico. También se ven ligeros desplazamientos en los máximos de excitación y emisión, entre  $358\text{-}362 \text{ nm}$  para emisión y  $283\text{-}295 \text{ nm}$  para excitación.



### Ácido 5-metil tetrahidrofólico

Finalmente, estudiamos la influencia de la acidez del medio en la fluorescencia del ácido 5-metil tetrahidrofólico (5M). Para ello, se preparó una disolución acuosa de  $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$  y  $0.1 \text{ M KCl}$ , a la que se le fue variando el pH mediante adición de HCl o NaOH. En la Figura V.7 se recogen los espectros obtenidos a diferentes valores de pH.

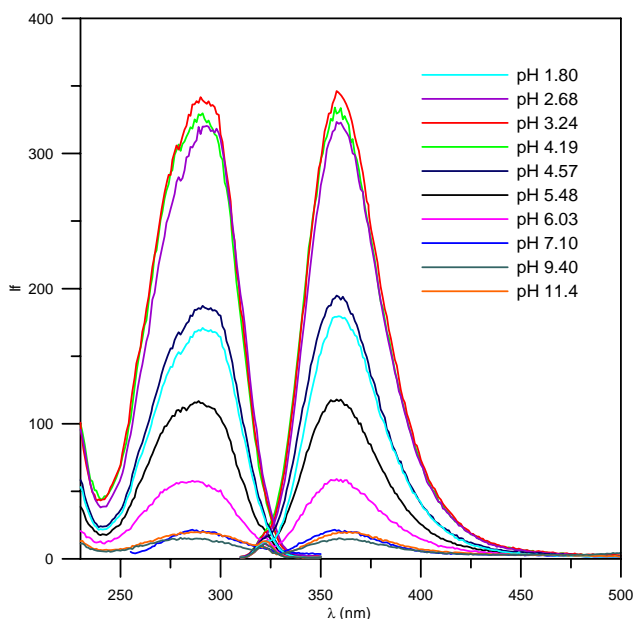


Figura V.7. Espectros de excitación y emisión del ácido 5M en función del pH.:  $\lambda_{ex} = 290 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 360 \text{ nm}$ ; Voltaje del fotomultiplicador =  $700 \text{ V}$ ; Rendijas ex/em =  $5/5 \text{ nm}$ ; Velocidad de barrido =  $10 \text{ nm/seg}$ ; Temperatura =  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ .  $[5M] = 0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$

Observamos como inicialmente aumenta la fluorescencia al disminuir la acidez del medio, alcanzando una señal máxima en torno a pH 4, para disminuir posteriormente, manteniéndose prácticamente constante a partir de pH 7. En este caso, no se observan desplazamientos notables de los máximos de fluorescencia.

Finalmente, se han representado las variaciones de la intensidad de fluorescencia normalizada del AF, THF y 5M con el pH, a las longitudes de onda máximas de emisión para cada analito ( $445$ ,  $362$  y  $360 \text{ nm}$ , respectivamente), Figura V.8.

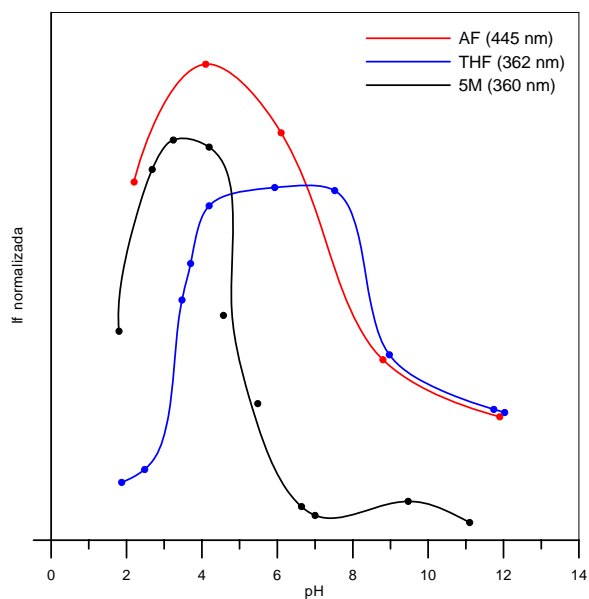


Figura V.8. Variación de la intensidad de fluorescencia medida a la  $\lambda_{em}$  máxima para cada analito ( $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), representada en función de la acidez del medio.

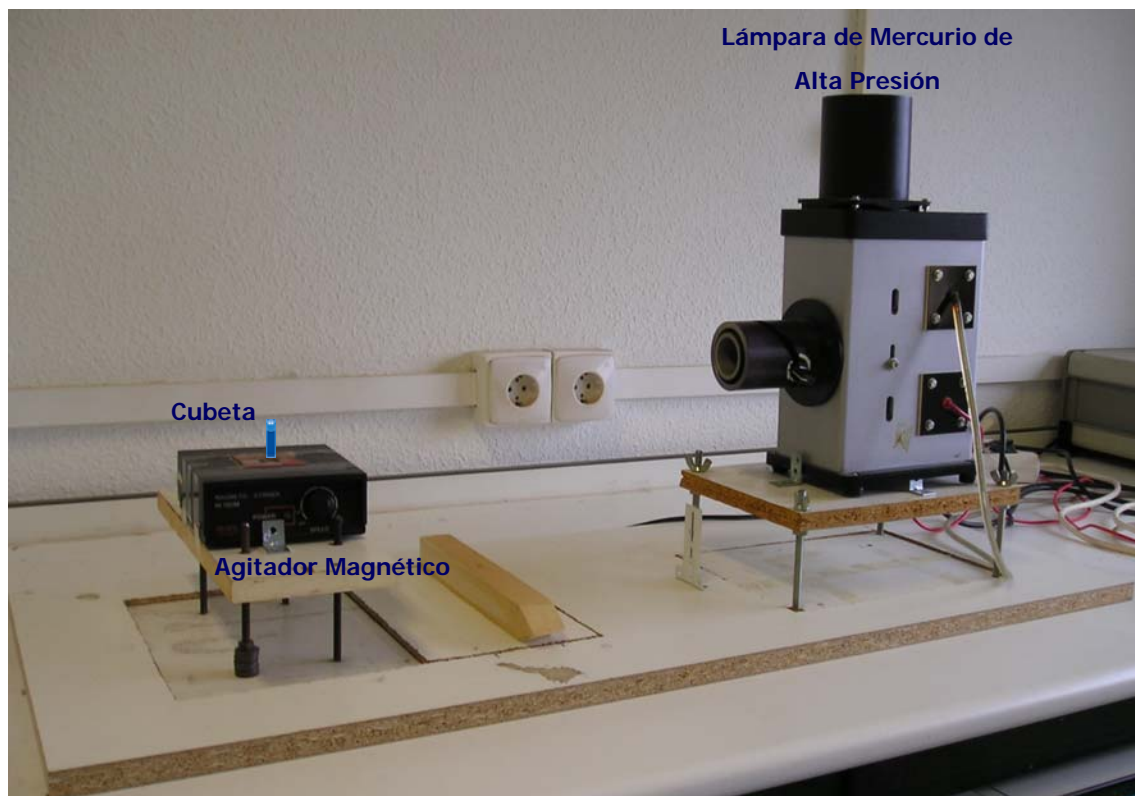
A partir de este estudio podemos concluir que un pH de 4 se puede elegir como adecuado para trabajar con estos tres analitos, ya que todos ellos presentan máxima fluorescencia a este valor de pH.

### V.2.1. Influencia de la radiación UV en la fluorescencia de AF, THF y 5M

Nuestro objetivo en este apartado no es el de caracterizar los diferentes fotoproductos formados a partir de los analitos, sino que pretendemos aprovechar esta transformación para poder aumentar la sensibilidad del método de determinación, sobre todo en el caso del ácido fólico, y poder realizar su determinación simultánea aprovechando las diferencias cinéticas de cada fotorreacción como parámetro discriminatorio.

Para realizar este estudio, se operó en modo estacionario, se prepararon disoluciones de los analitos en estudio en medio acuoso, a diferentes valores de pH, y se estudió la influencia del tiempo de irradiación en la fluorescencia y formación de los

fotoproductos correspondientes. Para ello se empleó una lámpara UV de Hg de alta presión y, tras irradiar las muestras directamente en la cubeta de medida (Figura V.9), se introdujeron en el espectrofluorímetro para registrar sus espectros de fluorescencia.



*Figura V.9. Sistema de irradiación en modo estacionario.*

## Ácido Fólico

En la Figura V.10 se muestra la influencia del tiempo de irradiación en la fluorescencia de  $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$  de AF a distintos valores de pH.

En general, e independientemente de la acidez del medio, se observa que cuando las disoluciones de AF se irradian, se produce un aumento de la fluorescencia de este compuesto a 445 nm, así como de los dos máximos de excitación que presenta.

Cuanto mayor es la acidez del medio, más rápidamente se alcanza la máxima señal de fluorescencia: 10 minutos para pH 3.82, 20 minutos para pH 5.65, y a pH 9.39 la fluorescencia aumenta durante todo el intervalo de tiempo estudiado. Además, comprobamos que al irradiar no se producen desplazamientos en los máximos de excitación y emisión de fluorescencia del ácido fólico.

De los estudios realizados, así como de los datos bibliográficos existentes, podemos concluir que el proceso de irradiación provoca la ruptura de la molécula de AF, generando un derivado pteridínico por eliminación de parte o el total de la cadena en C6. Este hecho justificaría el aumento del rendimiento cuántico de fluorescencia sin cambios apreciables en las longitudes de onda de los máximos.

En este caso, el proceso de fotoirradiación parece implicar únicamente la fotólisis de la molécula.

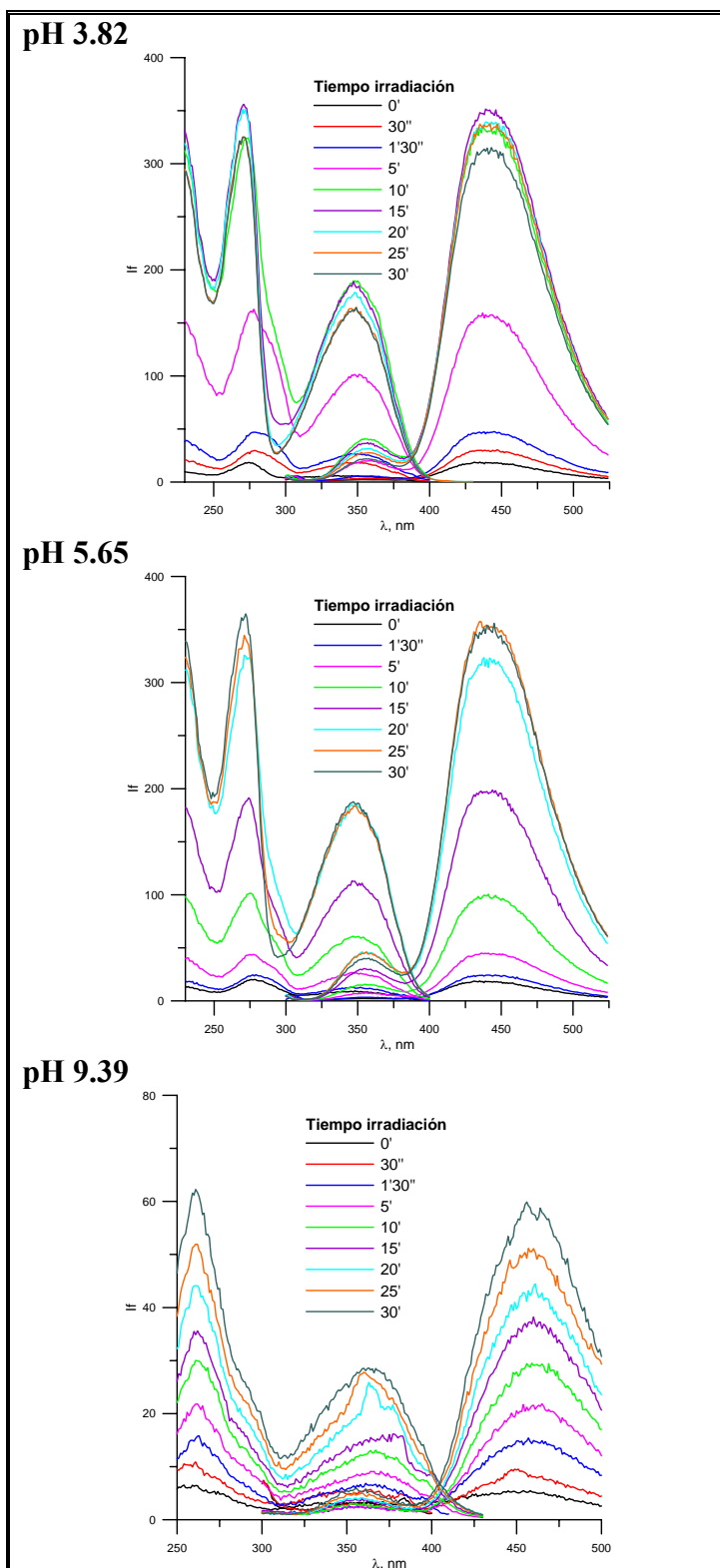


Figura V.10. Espectros de excitación y emisión de AF a distintos tiempos de irradiación y diferentes medios de acidez. Voltaje del fotomultiplicador = 700 V; Rendijas ex/em = 5/5 nm; Velocidad de barrido = 10 nm/seg; Temperatura= 20 °C. [AF] = 0.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

## Ácido Tetrahidrofólico

Un estudio similar se realiza para el THF, y los espectros obtenidos se reúnen en la Figura V.11.

En este caso, y para todos los valores de pH ensayados, se observa una gran diferencia entre los espectros antes y después de irradiar. Recién preparada la disolución, ésta presenta un máximo de excitación a 293 nm y de emisión a 362 nm. Al irradiar se desarrolla un máximo de emisión a 445 nm y uno de excitación a 350 nm, desplazándose el de 293 nm a 270 nm. Éstas longitudes de onda corresponden a las longitudes de onda características de las estructuras pteridínicas, lo que nos inclina a pensar que, como consecuencia de la irradiación, se origina una estructura pteridínica, que inicialmente no posee la molécula de THF. Luego el proceso de fotoirradiación parece implicar, además de la fotólisis descrita para el AF, una fotooxidación del anillo tetrahidropirazínico a pirazínico.

Una vez formado el fotoproducto, el comportamiento es similar al del AF, siendo la señal de fluorescencia del fotoproducto del THF mayor a valores de pH en torno a 4 y disminuyendo a medida que aumenta el valor de pH.

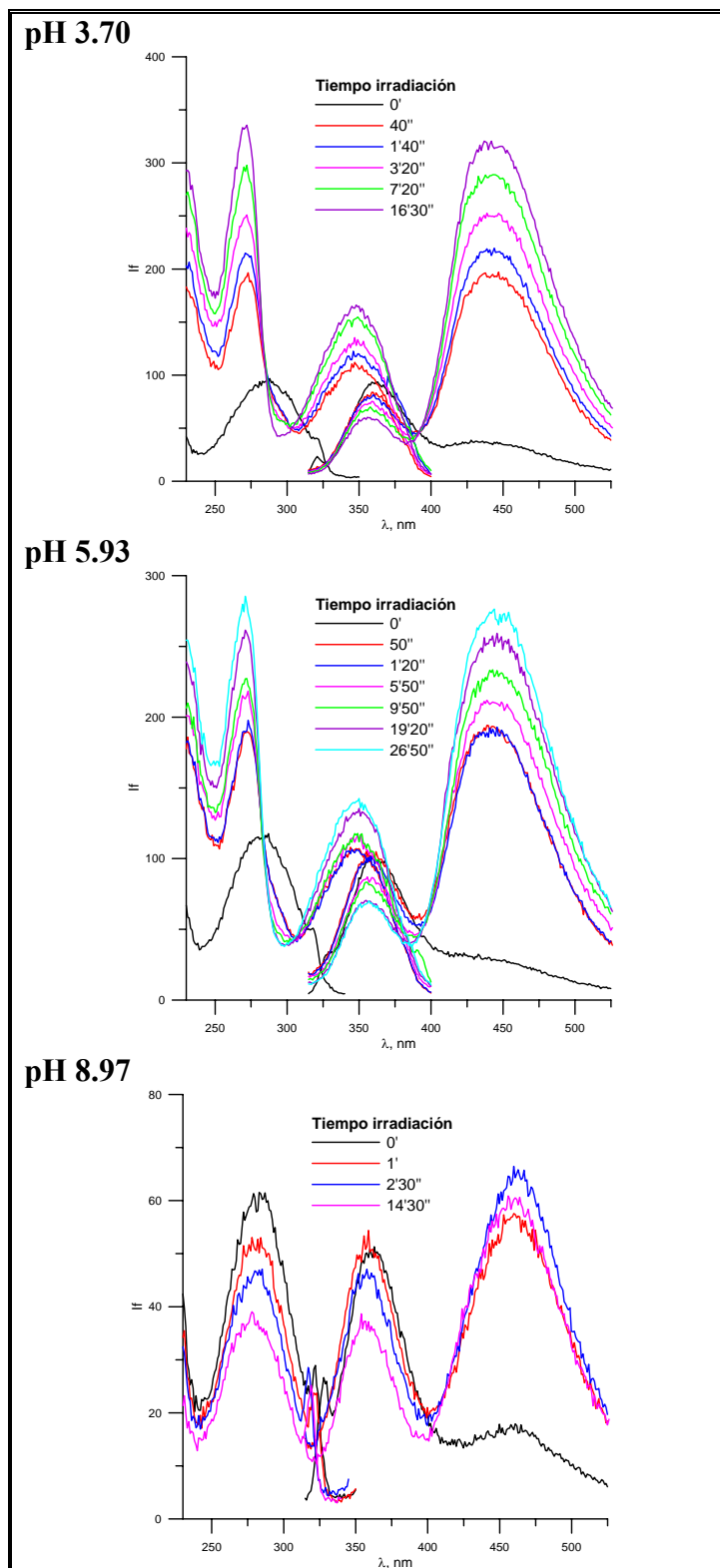


Figura V.11. Espectros de excitación y emisión de THF a distintos tiempos de irradiación y diferentes medios de acidez. Voltaje del fotomultiplicador = 700 V; Rendijas ex/em 5/5 nm; Velocidad de barrido = 10 nm/seg; Temperatura = 20 °C. [THF] = 0.5 µg mL<sup>-1</sup>.

### Ácido 5-metil tetrahidrofólico

Se puede observar que la fluorescencia de una disolución de ácido 5-metil tetrahidrofólico disminuye, a cualquier valor de pH, al aumentar el tiempo de irradiación, siendo la cinética más rápida a los valores de pH extremos, posiblemente debido a la participación de procesos de hidrólisis. En la Figura V.12 se muestra la influencia del tiempo de irradiación en una disolución de  $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$  de ácido 5-metil tetrahidrofólico a pH 6, donde, además, podemos observar que no se producen desplazamientos en los máximos de excitación y emisión de fluorescencia y que, después de irradiar durante 10 minutos, la fluorescencia se ha reducido prácticamente hasta la mitad.

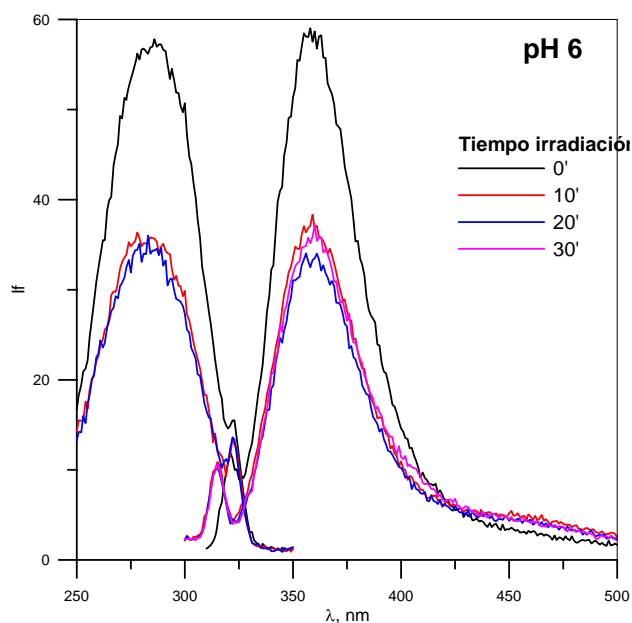


Figura V.12. Espectros de excitación y emisión del ácido 5M a distintos tiempos de irradiación.  $\lambda_{ex} = 290 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 360 \text{ nm}$ ; Voltaje del fotomultiplicador = 700 V; Rendijas exc/em 5/5 nm; Velocidad de barrido = 10 nm/seg; Temperatura = 20 °C.  $[5M] = 0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$

De esta experiencia parece desprenderse la conclusión de que la fotoirradiación de 5M produce la fotólisis de la molécula de forma prácticamente total, afectando posiblemente a ambos anillos y compitiendo favorablemente con la eliminación de las cadenas laterales observadas en los otros derivados.



Comparando los resultados obtenidos con los tres analitos, podemos concluir que, independientemente de la acidez del medio, la irradiación de los analitos es favorable en el caso del ácido fólico y del ácido tetrahidrofólico, produciéndose un aumento de la fluorescencia con respecto a los analitos de partida, como consecuencia de la formación de los fotoproductos. Sin embargo, en el caso del ácido 5-metil tetrahidrofólico, ocurre lo contrario. No obstante, emplearemos el diferente comportamiento de los analitos frente a la radiación UV, como parámetro discriminante, para determinarlos simultáneamente mediante un método cinético.

### ***V.2.2. Influencia de la radiación UV en la fluorescencia de AF, THF y 5M, en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>***

Teniendo en cuenta que, frecuentemente, las fotorreacciones de derivados similares tienen lugar a través de mecanismos radicalarios, se realizaron los estudios anteriores en presencia de peróxido de hidrógeno, con objeto de mejorar las cinéticas de las fotorreacciones estudiadas. De nuevo, empleamos una lámpara UV de Hg de alta presión (Figura V.9) y, tras irradiar las muestras, se introdujeron en el espectrofluorímetro para registrar los espectros de fluorescencia.

Inicialmente, se prepararon disoluciones que contenían un porcentaje de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entre el 1.1 y 5.5 % y, en todos los casos, observamos que disminuía la fluorescencia a medida que aumentaba el porcentaje de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el medio, probablemente debido a unas cinéticas excesivamente rápidas y a procesos de descomposición total de los fotoproductos, por lo que se realizó este estudio empleando porcentajes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inferiores, entre 0.0016 y 0.055 %.

En la Figura V.13 se muestra la variación de la intensidad de fluorescencia, en disoluciones de pH 4, empleando diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, en función del tiempo de irradiación. Las curvas que aparecen han sido obtenidas a 445 nm, excitando a 275 nm, para el AF y el ácido THF y, a 360 nm, excitando a 275 nm, para el 5M.

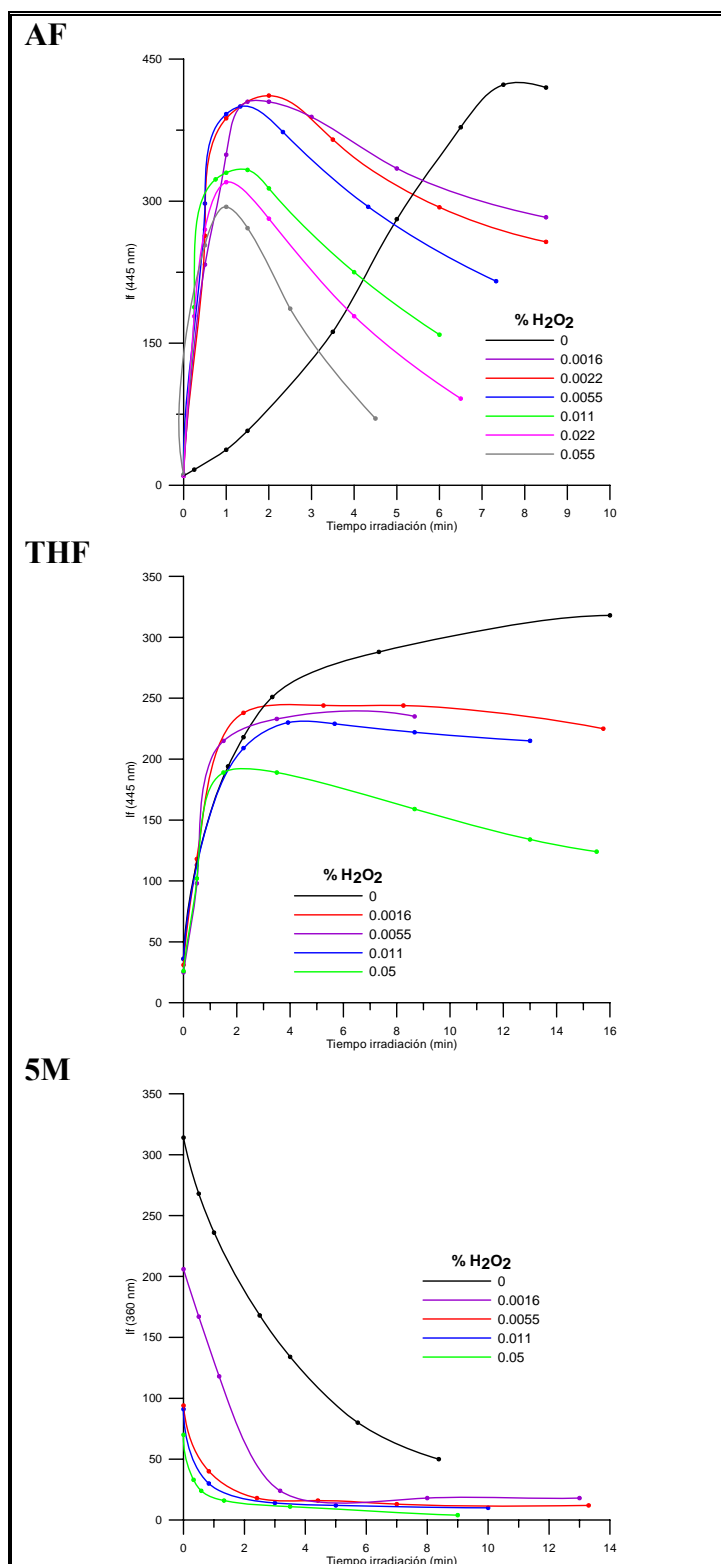


Figura V.13. Influencia del tiempo de irradiación en la intensidad de fluorescencia en función del porcentaje de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. pH = 4; [analito] = 0.5 µg mL<sup>-1</sup>.

Se puede observar que la formación de los fotoproductos del AF y THF es más rápida en presencia de  $H_2O_2$ . En ambos casos, aumenta la señal de fluorescencia con el tiempo de irradiación para luego disminuir, en el caso del AF de forma más rápida que para el ácido THF, probablemente debido a la descomposición del fotoproducto. Además, ambas cinéticas se ven favorecidas con el porcentaje de  $H_2O_2$  en el medio. En el caso del 5M, la cinética de descomposición de este analito también se ve favorecida al aumentar el porcentaje de  $H_2O_2$ .

De este estudio podemos concluir que, aunque el peróxido de hidrógeno acelera considerablemente las fotorreacciones estudiadas, también aumenta considerablemente la cinética de descomposición de los fotoproductos formados, desapareciendo prácticamente la fluorescencia en menos de tres minutos, en el caso del AF y 5M. Esta elevada velocidad de descomposición observada, hace inviable la determinación de estos analitos, por lo que decidimos no emplear peróxido de hidrógeno en el medio, con objeto de tener unas cinéticas más lentas, pero adecuadas para seguir la evolución de estas tres reacciones de forma simultánea.

### **V.3. RESOLUCIÓN DE LA MEZCLA BINARIA DE AF Y 5M CON MÉTODOS DE CALIBRACIÓN MULTIVARIANTE DE SEGUNDO ORDEN**

Basándonos en los ensayos anteriores, se decidió realizar la determinación indirecta de AF, 5M y THF, siguiendo la cinética de la fotorreacción en presencia de luz UV. En primer lugar, abordaremos la resolución de la mezcla binaria de AF y su metabolito, 5M. Para ello, emplearemos métodos de calibración multivariante de segundo orden, registrando la evolución cinética de los espectros de emisión de fluorescencia de los fotoproductos con el tiempo de irradiación. Posteriormente, se abordará la resolución de la mezcla ternaria de AF, 5M y THF y, debido a la incapacidad de los métodos de calibración multivariante de segundo orden para resolver el problema, se emplearán métodos de calibración multivariante de tercer orden, registrando la evolución de las matrices de excitación-emisión de fluorescencia con el tiempo.

Se decidió abordar la determinación conjunta del AF y 5M siguiendo las fotorreacciones de formación del fotoproducto en el caso del AF y de descomposición en el caso del 5M.

Con objeto de automatizar la toma de datos, diseñamos un sistema de irradiación en continuo, que nos permite realizar el registro de espectros de excitación y emisión con el tiempo de irradiación. Un esquema del montaje empleado se muestra en la Figura V.14.

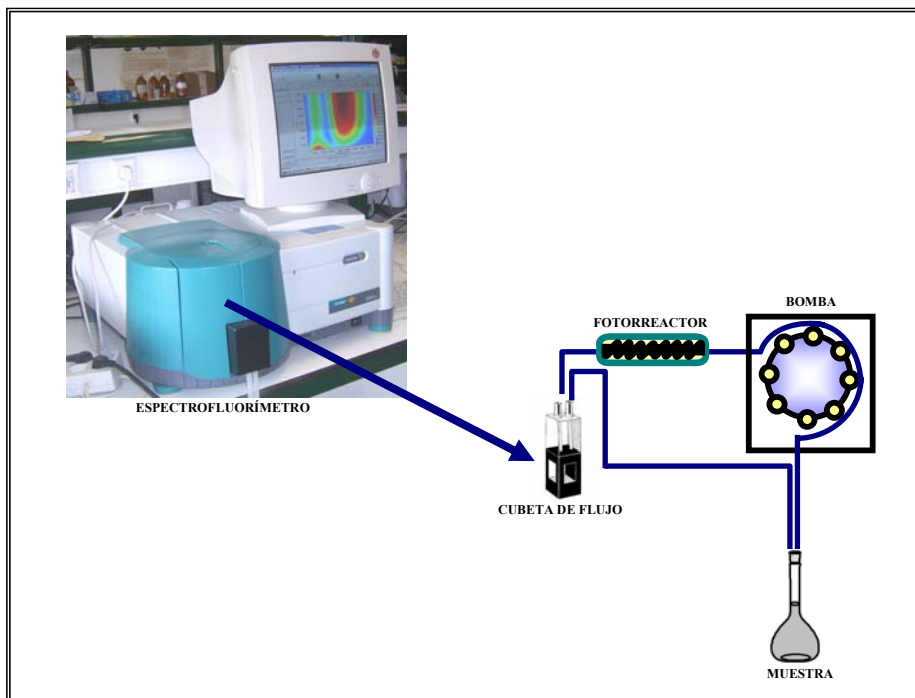


Figura V.14. Montaje del método propuesto para la toma de datos en continuo.

Las variables instrumentales que afectan al método son, lo suficientemente numerosas, como para plantearnos el uso del diseño de experimentos y de la metodología de superficie de respuesta, para optimizar estas variables con el menor número de experiencias posibles.

Estas variables son:

- Voltaje del fotomultiplicador (V)
- Rendija del monocromador de emisión (nm)
- Rendija del monocromador de excitación (nm)
- Incremento de longitud de onda (nm)
- Velocidad de barrido (nm/min)
- Longitud del reactor (m)
- Velocidad de la bomba (rpm)

### V.3.1. Superficie de respuesta y diseño de experimentos. Fundamento teórico

La metodología de superficie de respuesta (*Response Surface Methodology*, *RSM*) es un conjunto de técnicas, estadísticas y matemáticas, utilizadas para el establecimiento del mejor valor de una variable de respuesta (variable de salida) y los valores de los factores (variables de entrada), que producen dicho valor óptimo [46].

La aplicación de RSM más habitual es aquella en la que existen varias variables de entrada que, potencialmente, influyen sobre el funcionamiento o alguna característica de calidad de un proceso. Esto último, la característica o el funcionamiento, se conoce como *función de respuesta*. Las variables de entrada son conocidas como *variables independientes* y están sujetas a control por parte del operador. El campo de la RSM se engloba en una estrategia experimental por la que se explora el espacio de las variables independientes, desarrollándose un modelo estadístico y experimental, por el que se establece una relación aproximada entre la respuesta y las variables del proceso. Es, por tanto, un método de optimización que permite encontrar los valores de las variables independientes que producen unos determinados valores en la respuesta, valores que, generalmente, suelen hacerse máximos o mínimos, según el caso.

En esta memoria, se buscará un modelo apropiado que relacione nuestra respuesta  $y$  con las variables independientes  $\xi_1, \xi_2, \dots, \xi_k$ . En general, la relación anterior se puede expresar como:

$$y = f(\xi_1, \xi_2, \dots, \xi_k) + \varepsilon \quad (\text{ec. V.9.})$$

donde la forma de la función  $f$  es desconocida y, probablemente, muy complicada, y  $\varepsilon$  es un término que representa otras fuentes de variación que no se han tenido en cuenta para  $f$ . Usualmente,  $\varepsilon$  incluye efectos como errores aleatorios de la respuesta, ruido de fondo, efectos de otras variables no tenidas en cuenta, etc.

Las variables  $\xi_1, \xi_2, \dots, \xi_k$  se conocen como *variables naturales*, debido a que se expresan en las unidades naturales de medida ( $^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{mol L}^{-1}$ , etc). En la mayoría de los trabajos con RSM es necesario transformar las variables naturales en variables codificadas  $x_1, x_2, \dots, x_k$ , las cuales son definidas como adimensionales con media cero y con la misma desviación estándar. En términos de las variables codificadas, la función de respuesta puede escribirse como:

$$\eta = f(x_1, x_2, \dots, x_k) \quad (\text{ec. V.10.})$$

Debido a que la forma de la verdadera función  $f$  es desconocida, se debe hacer una aproximación. De hecho, el éxito de RSM está críticamente relacionado con la habilidad del operador para desarrollar una buena aproximación de  $f$ . Usualmente, suelen utilizarse polinomios de bajo grado, como de primer o de segundo orden.

Los modelos de primer orden son adecuados en el caso de que el operador esté interesado en aproximar la superficie de respuesta verdadera a una región relativamente pequeña del espacio de las variables independientes, donde hay una pequeña curvatura en la función  $f$ .

Para el caso de dos variables independientes, el modelo de primer orden que se obtiene, en términos de variables codificadas, es:

$$\eta = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 \quad (\text{ec. V.11.})$$

El modelo de primer orden expuesto se conoce, a veces, como *modelo de efectos principales*, debido a que sólo incluye los efectos principales de las dos variables  $x_1$  y  $x_2$ . Si hubiera una interacción entre estas variables, el modelo se cambiaría y tomaría la forma de la ecuación V.13.

$$\eta = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{12} x_1 x_2 \quad (\text{ec. V.12.})$$

Al añadir al modelo la interacción entre las variables se introduce una curvatura en la función de respuesta.

Usualmente, la curvatura que se induce, al introducir en un modelo de primer orden el término de la interacción entre variables, no es adecuada y se aleja bastante de la superficie de respuesta verdadera. En este caso, un modelo de segundo orden podría ser adecuado. En el caso de dos variables, el modelo de segundo orden adquiere la forma:

$$\eta = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{12} x_1 x_2 \quad (\text{ec. V.13.})$$

El modelo de segundo orden puede usarse como una aproximación a la superficie de respuesta verdadera, en una región relativamente pequeña.

El modelo de segundo orden es ampliamente utilizado por varias razones:

- 1) El modelo de segundo orden es muy flexible. Puede tomar una gran variedad de formas, con lo que usualmente funciona bien como una aproximación a la superficie de respuesta verdadera.
- 2) Es relativamente fácil estimar los parámetros (coeficientes  $\beta$ ) de un modelo de segundo orden. Para este fin, suele utilizarse el método de mínimos cuadrados.
- 3) Existe una amplia experiencia que indica que los modelos de segundo orden funcionan bien en la resolución de problemas reales.

En general, la forma de los modelos de primer orden se puede expresar como:

$$\eta = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_k x_k \quad (\text{ec. V.14.})$$

y la de los modelos de segundo orden como:

$$\eta = \beta_0 + \sum_{j=1}^k \beta_j x_j + \sum_{j=1}^k \beta_{jj} x_j^2 + \sum_{i < j=2}^k \sum_{j=2}^k \beta_{ij} x_i x_j \quad (\text{ec. V.15.})$$

En algunas ocasiones, se utilizan polinomios de orden superior a dos, si bien eso es muy poco frecuente.



La superficie representada por el modelo polinómico se denomina *Superficie de Respuesta* y el ajuste de su ecuación implica la realización de experiencias a más de dos niveles para cada factor, llevándose a cabo la selección de las experiencias por medio del uso de algún *diseño experimental* apropiado.

El fin de un diseño experimental consiste fundamentalmente en obtener la máxima información posible con el menor número de experimentos y centrarse, únicamente, en la recogida de la información estrictamente necesaria. Se diseñan o proyectan un pequeño número de experimentos que se realizan en unas condiciones controladas. Existen diferentes tipos de diseño en función de las características del sistema y el objetivo que se pretende conseguir. Así, si realizamos un análisis exploratorio (screening) para eliminar las variables no significativas en un sistema, elegimos un *diseño factorial fraccionado* y, si queremos los valores óptimos de las variables significativas de dicho sistema realizamos, por ejemplo, un *diseño central compuesto*. Estos dos diseños son los que hemos usado en este trabajo y, a continuación, describimos cada uno de ellos.

#### ➤ *Diseño factorial fraccionado*

En este diseño, cada factor tiene únicamente dos niveles y no permite estudiar las interacciones entre las distintas variables o factores, salvo en casos muy concretos. Además, este diseño no permite interpretar los resultados con una superficie de respuesta, sólo permite un análisis de efectos principales para ver que factores influyen de forma significativa en el experimento en cuestión. Como hemos indicado, se utiliza sobre todo para realizar un screening y, con ello, intentar reducir el número de factores en un proceso de optimización cuando éste es elevado. De esta forma, sólo realizaremos la optimización con los factores que influyen de forma significativa.

El número de condiciones experimentales,  $N$ , requeridas en un diseño de este tipo, se deduce de la siguiente ecuación:

$$N = 2^f \quad (\text{ec. V.16.})$$

donde  $f$  es el número de factores o variables.

### ➤ Diseño Central Compuesto (DCC)

Un modelo de segundo orden puede construirse eficientemente con un *diseño central compuesto* [47]. En este diseño, cada factor tiene cinco niveles, en lugar de tres, como tienen los diseños convencionales. En el caso de tres factores, éstos serán: estrella bajo, cubo bajo, central, cubo alto, estrella alto. Cubo alto y bajo son los niveles superiores e inferiores que se especifican al definir las variables de diseño. Las muestras estrella están localizadas fuera del cubo. Como resultado, todas las muestras, excepto la central, están localizadas en la misma esfera (si se dispone de tres factores) o en una hiperesfera en los demás casos y, por consiguiente, la información que llevan tendrá el mismo peso en los análisis (rotatividad). La dificultad de ajustar estos niveles es la principal desventaja de este tipo de diseño que, por otra parte, posee muy buenas propiedades estadísticas.

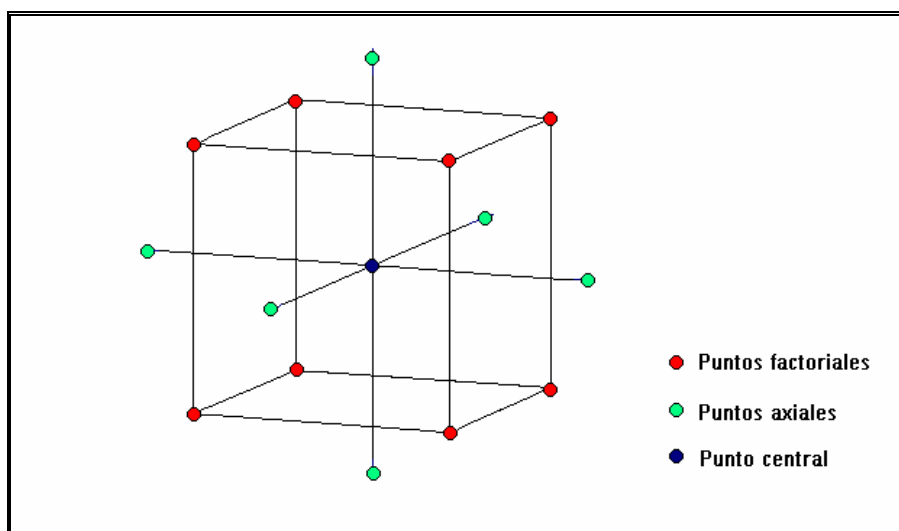


Figura V.15. DCC para tres factores.

Una vez realizados los experimentos determinados por el tipo de diseño elegido, se procede a la determinación de los coeficientes polinómicos del modelo experimental. Del estudio del mismo puede deducirse no sólo la forma de dependencia de la respuesta con las variables consideradas, sino las condiciones óptimas buscadas.

Habitualmente se realiza un Análisis de la Varianza (ANOVA), con el que se comprobará la significancia del modelo, la utilidad de las interacciones y los términos cuadrados, la calidad del ajuste del modelo y, en último término, la bondad de la superficie de respuesta. Para ello, utilizaremos el programa informático *THE UNSCRAMBLER*, que permite realizar, entre otros, el ANOVA, estudio de residuos, análisis de efectos, representación gráfica de la superficie de respuesta en el espacio tridimensional, así como lo que se conoce como mapa de contorno, para cada dos variables. Dichos contornos son curvas de respuesta constante, dibujadas en el plano, mientras se mantienen fijas el resto de las variables y corresponden a una altura concreta de la superficie de respuesta representada de forma tridimensional.

La bondad de la superficie de respuesta la indica el ANOVA a través de los parámetros, coeficiente de determinación ( $R^2$ ), falta de ajuste del modelo cuadrático (Lack of Fit) y chequeo del modelo cuadrático (Model Check Quadratic). Estos dos últimos parámetros tienen unos determinados valores “p” (nivel de significación) de tal forma que, para un nivel de confianza del 95 %, un valor de p inferior a 0.05 para Model Check Quadratic, indica que la parte cuadrática del modelo es significativa, es decir, que las interacciones y términos cuadrados incluidos en el modelo son útiles; un valor de p superior a 0.05 para Lack of Fit, indica que la pérdida o falta de ajuste del modelo no es significativa. Por otra parte, el  $R^2$  interesa que sea próximo a 0.9. El ANOVA que presenta un buen valor de  $R^2$  lleva asociado un buen valor de Model Check Quadratic y Lack of Fit y, en definitiva, se concluye que la superficie de respuesta es válida para elegir el punto óptimo que, generalmente, son las condiciones de las variables que maximizan la respuesta elegida. Dicho punto también lo presenta el ANOVA, aunque se puede deducir analizando la superficie de respuesta en su forma tridimensional o como mapa de contorno. En el caso del mapa de contorno, se puede

deducir una zona alrededor del punto óptimo, donde la respuesta no presenta una diferencia significativa respecto a la respuesta máxima, dicha zona será interesante puesto que describe unos valores de las variables que pueden ser considerados también como óptimos. Además, el ANOVA presenta los valores “p” para cada uno de los factores y las interacciones entre ellos, de forma que un valor de p inferior a 0.05 indica que ese factor o interacción influye de forma significativa con un 95 % de probabilidad.

El estudio de los residuos permite la detección de posibles outliers (muestras que no se ajustan al modelo) y, por último, la visualización de las superficies o de las gráficas de contornos, posibilita una interpretación final.

El análisis de efectos se usa cuando no disponemos de un modelo cuadrático, sino de uno lineal. El interés de este análisis radica en detectar cuales son los factores que influyen de forma significativa y cuales de forma no significativa. Normalmente se utiliza en un *screening*, como se ha comentado anteriormente, cuyo objetivo final es la eliminación de factores no significativos, para optimizar sólo los factores significativos.

### ***V.3.2. Optimización de variables instrumentales***

Como se ha indicado anteriormente, para la optimización mediante la metodología de superficie de respuesta se precisa un diseño de experimentos. Este diseño experimental, así como la optimización se realizan con el programa THE UNSCRABLER 6.11, que trabaja bajo el entorno Windows XP. Sin embargo, un diseño experimental con siete variables, conllevaría un número de experiencias muy elevado que muy difícilmente se concretarían en una jornada de laboratorio. Por lo tanto, realizamos un procedimiento de *screening* previo, para conocer qué variables influyen de forma significativa y cuáles no son significativas, en las funciones de respuesta seleccionadas: relación señal/ruido, a tiempo inicial, FR1, y a tiempo final de la fotorreacción, FR2, (ec. V.17 y V.18). Las variables que no influyan de forma

significativa en la función de respuesta se pueden fijar o eliminar. El objetivo es reducir el número de variables y afrontar la optimización con el menor número posible.

Debido a que nuestro primer objetivo era la resolución de la mezcla binaria de AF y 5M, empleando la evolución de los espectros de emisión con el tiempo, se empleó esta mezcla para optimizar todas las variables instrumentales. La señal del espectro obtenido, a tiempo inicial, fue la intensidad de fluorescencia a 360 nm (debida fundamentalmente al 5M) y, a tiempo final, la intensidad de fluorescencia a 445 nm (debida fundamentalmente al AF).

Para calcular el ruido instrumental se filtraron cada uno de los espectros de emisión de fluorescencia, utilizando el algoritmo de Savitsky-Golay. El espectro filtrado se resta al espectro sin filtrar y se calcula la desviación estándar en todo el intervalo de longitudes de onda. El valor obtenido representa el ruido del espectrofluorímetro asociado a cada medida.

Por lo tanto, las funciones de respuestas empleadas fueron:

$$FR1 = \left( \frac{Señal}{Ruido} \right)_{inicial} = \frac{I_F(360nm)}{SD(espectro\ filtrado - espectro)} \quad (ec. V.17.)$$

$$FR2 = \left( \frac{Señal}{Ruido} \right)_{final} = \frac{I_F(445nm)}{SD(espectro\ filtrado - espectro)} \quad (ec. V.18.)$$

Para realizar el *screening* empleamos un diseño factorial fraccionado, puesto que este diseño nos permite estudiar, con un número relativamente pequeño de experiencias, los efectos principales de muchas variables de diseño (3 a 15) en una o varias respuestas. También permite estudiar las interacciones entre las variables de diseño. Del análisis de los efectos se puede concluir qué variables son significativas y cuáles no. En este diseño cada variable o factor tiene dos niveles, que coinciden con los valores máximos y mínimos del intervalo estudiado. Los intervalos de estas variables se establecieron realizando varias experiencias previas para evitar la saturación del

detector, espectros excesivamente deformados y cinéticas inadecuadas. Así pues, estos valores fueron los que se muestran en la Tabla V.1

*Tabla V.1. Niveles superiores e inferiores de las variables instrumentales para el screening.*

<b>Variable instrumental</b>	<b>Valor mínimo</b>	<b>Valor máximo</b>
Voltaje del fotomultiplicador (V)	550	750
Rendija del monocromador de emisión (nm)	5	10
Rendija del monocromador de excitación (nm)	5	10
Incremento de longitud de onda (nm)	1	5
Velocidad de barrido (nm/min)	3200	4800
Longitud del reactor (m)	0	2
Velocidad de la bomba (rpm)	10	48

El diseño factorial fraccionado presenta una tabla de experimentos con un total de 11 experiencias.

Empleamos una cubeta de flujo con paso de luz de 1 cm, ajustando el volumen de muestra a la capacidad del sistema en cada ensayo, y registramos la evolución de los espectros de emisión de los fotoproductos con el tiempo, así como las curvas cinéticas.

Como podemos observar en la Figura V.16, la cinética del 5M, en las condiciones indicadas a pie de figura, finaliza aproximadamente a los 8 minutos, mientras que la del AF, más lenta, no llega a completarse hasta los 30 minutos. Por ello, registraremos la evolución de los espectros de emisión con el tiempo de irradiación durante 30 minutos, registrando un espectro de emisión ( $\lambda_{\text{ex}} = 275 \text{ nm}$ ) cada minuto, de una mezcla de  $0.3 \mu\text{g mL}^{-1}$  de AF y 5M, a pH 4.

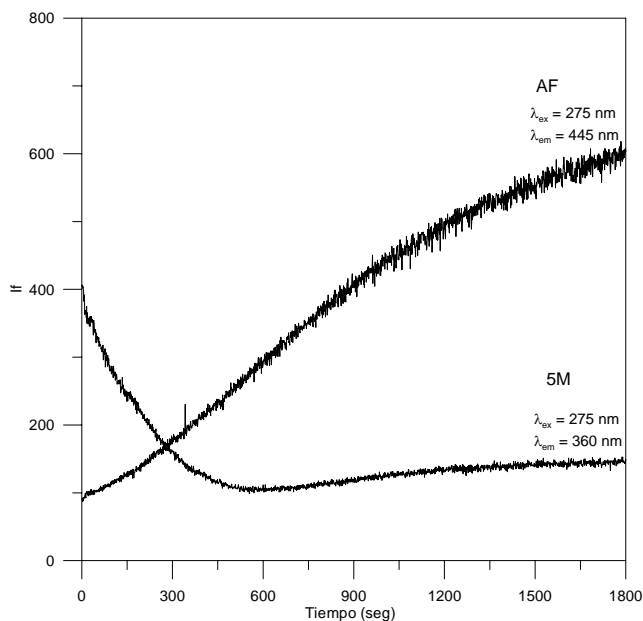


Figura V.16. Curvas cinéticas de una mezcla de  $0.3 \mu\text{g mL}^{-1}$  de AF y 5M, pH 4. Voltaje del fotomultiplicador = 700 V; rendijas exc/em 5/10 nm; velocidad de la bomba = 48 rpm; longitud del reactor = 1.5 m.

Para interpretar los resultados no podemos hacer una superficie de respuesta, porque este diseño no permite un ajuste cuadrático, sólo lineal. Por lo tanto, realizamos un *análisis de efectos* (Effects Analysis) con el programa Unscrambler. Con este análisis observamos qué variables influyen más en cada respuesta y de qué forma. Si una variable o factor produce una respuesta alta, su efecto será alto y positivo y viceversa. En la Tabla V.2 se muestran los resultados obtenidos empleando la respuesta a tiempo inicial y final.

Tabla V.2. Resultados del test de significancia.

VARIABLE	Efecto		Valor de p		FR1	FR2
	FR1	FR2	FR1	FR2		
Voltaje del fotomultiplicador	375.823	461.845	0.0368	0.1019	+	NS*
Rendija del monocromador de emisión	841.972	485.605	0.0335	0.0231	+	+
Rendija del monocromador de excitación	558.723	384.935	0.0518	0.0502	NS*	NS*
Incremento de longitud de onda	974.018	1211	0.0056	0.0174	++	++
Velocidad de barrido	-398.162	-406.760	0.0321	0.0923	-	NS*
Longitud del reactor	-38.903	-364.350	0.0573	0.7932	NS*	NS*
Velocidad de la bomba	-536.953	-350.010	0.0617	0.0540	NS*	NS*

NS\*: No significativo.

Del análisis de efectos, con ambas funciones de respuesta, concluimos que la longitud del reactor, la velocidad de la bomba y la rendija del monocromador de excitación del espectrofluorímetro, no influyen significativamente en las funciones de respuesta, por lo que fijamos la longitud del reactor en 1.5 metros y la velocidad de la bomba en 10 rpm (ya que a menor longitud del reactor y mayor velocidad de la bomba necesitamos más tiempo para que se completen ambas reacciones).

La velocidad de barrido del espectrofluorímetro y el voltaje del fotomultiplicador parece que no influyen significativamente en la relación S/N a tiempo final, FR2, pero debido a su influencia al inicio de la reacción, FR1, optimizaremos ambos parámetros.

No se optimizó el efecto del monocromador de emisión debido a la imposibilidad de fijar los valores propuestos por el diseño. Sin embargo, se fijó el mayor valor debido a su efecto positivo y basándonos en ensayos previos. Así, se fijaron los monocromadores de excitación y emisión en 5 y 10 nm, respectivamente.



Una vez reducido el número de variables a optimizar, la velocidad de barrido del espectrofluorímetro, el incremento de longitud de onda y el voltaje del fotomultiplicador, se utilizó un diseño central compuesto, el cual nos permite una interpretación de los resultados usando la metodología de superficie de respuesta. Cada variable presenta cinco niveles o valores (cubo alto y bajo, estrella alto y bajo y central) lo que permite ajustar los resultados de las experiencias a un modelo cuadrático, es decir, a una curva.

Con el diseño anterior, generamos una tabla con una total de 17 experimentos, Tabla V.3.

*Tabla V.3. Experimentos realizados para optimizar las variables instrumentales.*

<b>Experimento *</b>	<b>Voltaje (V)</b>	<b>Vel. Barrido (nm/min)</b>	<b><math>\Delta\lambda</math> (nm)</b>	
1	Cube006a	730	3200	4
2	Cent-c	645	3600	3
3	*L:B-a	645	2400	3
4	Cube007a	560	4800	4
5	*H:A-a	750	3600	3
6	Cube005a	560	3200	4
7	*L:A-a	500	3600	3
8	*H:B-a	645	7200	3
9	Cent-b	645	3600	3
10	*H:C-a	645	3600	5.25
11	Cent-a	645	3600	3
12	*L:C-a	645	3600	0.75
13	Cube001a	560	3200	2
14	Cube003a	560	4800	2
15	Cube008a	730	4800	4
16	Cube004a	730	4800	2
17	Cube002a	730	3200	2

\*Los experimentos están numerados de acuerdo con la secuencia aleatoria generada por el programa The Unscrambler.

Se realizaron las experiencias y, las respuestas examinadas para construir la superficie de respuesta fueron, de nuevo, la relación S/N a tiempos inicial y final de la fotorreacción, FR1 y FR2, respectivamente.

Una vez que se obtuvieron las superficies para cada respuesta, concluimos que la mejor respuesta es la relación S/N a tiempo final, FR2, puesto que los valores del coeficiente de determinación ( $R^2$ ), comprobación del modelo cuadrático (Model Check Quadratic) y pérdida de ajuste (Lack of Fit) eran más favorables. Además, emplear la relación S/N a tiempo final tiene más sentido ya que, a tiempo inicial, además de las variables estudiadas, en la señal de medida también influye la temperatura de la cubeta de medida.

Las características de la superficie de respuesta elegida como válida son:

- $R^2 = 0.970$
- Comprobación del modelo cuadrático = 0.0241 ( $p < 0.05$ )
- Falta de ajuste = 0.1750 ( $p > 0.05$ )

Estos datos indican que el modelo cuadrático es óptimo y la pérdida de ajuste no es significativa, además, el valor  $R^2$  indica la bondad del modelo.

Aplicando el ANOVA al análisis de los “valores p”, para la superficie de respuesta elegida como óptima, se deducen qué variables influyen de forma significativa, ( $p < 0.05$ ). En este caso, tan sólo es significativo el incremento de longitud de onda ( $\Delta\lambda$ ) ( $p = 0.0000$ ) y su interacción consigo misma ( $p = 0.0013$ ). Sin embargo, no son significativas las otras variables ni el resto de interacciones, cuyos  $p > 0.05$ .

Del test de ANOVA también se deduce la ecuación que describe el modelo cuadrático y que es la siguiente:

$$\mathbf{R} = 0.504 \mathbf{A} - 0.119 \mathbf{B} + 5.457e02 \mathbf{C} - 4.804e-04 \mathbf{AB} + 5.322e-02 \mathbf{AC} - 0.118 \mathbf{BC} + 4.846e-03 \mathbf{A}^2 + 3.818e-05 \mathbf{B}^2 + 1.574e02 \mathbf{C}^2 + 6.604e02$$

donde **A**, **B** y **C** son el voltaje del fotomultiplicador, la velocidad de barrido del espectrofluorímetro y el incremento de longitud de onda, respectivamente.

La superficie de respuesta generada por dicha función se representa en la Figura V.17. En realidad, se muestran tres superficies deducidas de la combinación de las tres variables a optimizar.

Las superficies de respuesta obtenidas no presentan un máximo bien definido, que se correspondería con los valores óptimos. Parecería que para alcanzar este máximo habría que aumentar aún más el incremento de longitud de onda, que implicaría una gran pérdida de información espectral; disminuir la velocidad de barrido, que se traduciría en una mayor lentitud a la hora de registrar los datos; y aumentar el voltaje del fotomultiplicador, que podría producir la saturación del detector en el análisis de muestras de los analitos más concentradas o biológicas. Debido a estos motivos, fijamos los valores de éstas variables que nos proporcionan mayor valor en la superficie de respuesta: voltaje del fotomultiplicador 750 V, incremento de longitud de onda 5 nm y velocidad de barrido del espectrofluorímetro 2400 nm/min.

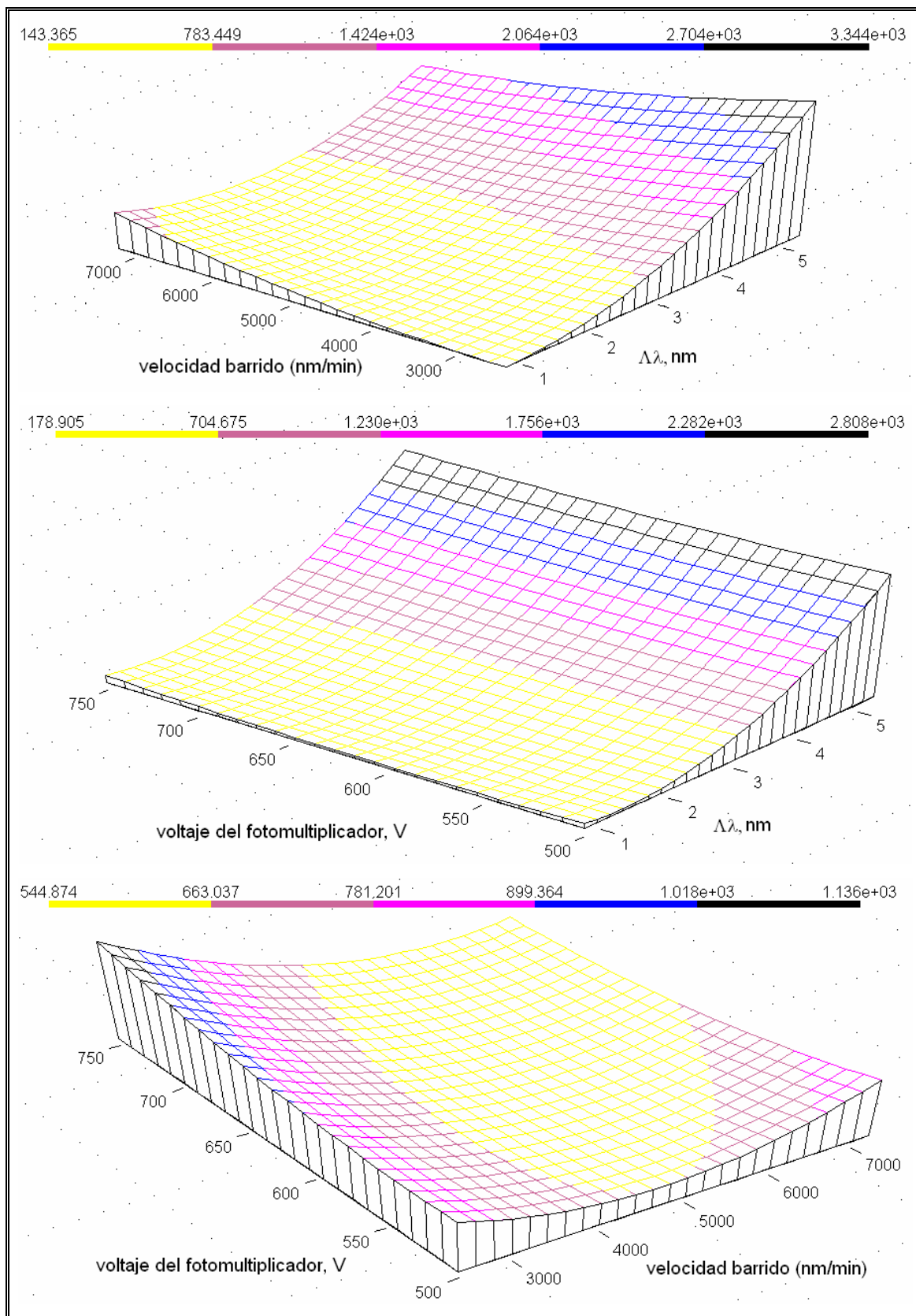


Figura V.17. Superficies de respuesta óptima.

En la Tabla V.4 se recogen los valores fijados para las distintas variables instrumentales.

*Tabla V.4. Variables instrumentales óptimas.*

<b>Variable instrumental</b>	<b>Valor</b>
Voltaje del fotomultiplicador (V)	750
Rendija del monocromador de emisión (nm)	10
Rendija del monocromador de excitación (nm)	5
Incremento de longitud de onda (nm)	5
Velocidad de barrido (nm/min)	2400
Longitud del reactor (m)	1.5
Velocidad de la bomba (rpm)	10

### ***V.3.3. Optimización de las condiciones físico-químicas de las reacciones***

Una vez optimizadas las variables instrumentales, vamos a pasar a estudiar y optimizar las variables físico-químicas que influyen en las cinéticas de las fotorreacciones.

Para optimizar las variables químicas, empleamos el montaje ya optimizado y registramos los espectros de emisión de cada analito, antes y después de irradiar, así como las curvas cinéticas de las fotorreacciones, excitando en todos los casos a 275 nm.

A partir de los estudios fluorimétricos iniciales, seleccionamos un pH 4 en el medio, ya que vimos que esta acidez nos proporcionaba la mayor señal de fluorescencia de los analitos. Para fijar este pH empleamos un tampón ácido acético/acetato sódico, 0.5 M.

➤ *Influencia de la concentración de tampón*

El estudio de la influencia de la concentración de tampón, se realiza variando la concentración de disolución reguladora entre 0.01 y 0.1 M. En la Figura V.18 se muestran los espectros de emisión del fotoproducto del AF tras irradiar durante 20 minutos y del 5M sin irradiar, con distintas concentraciones de tampón.

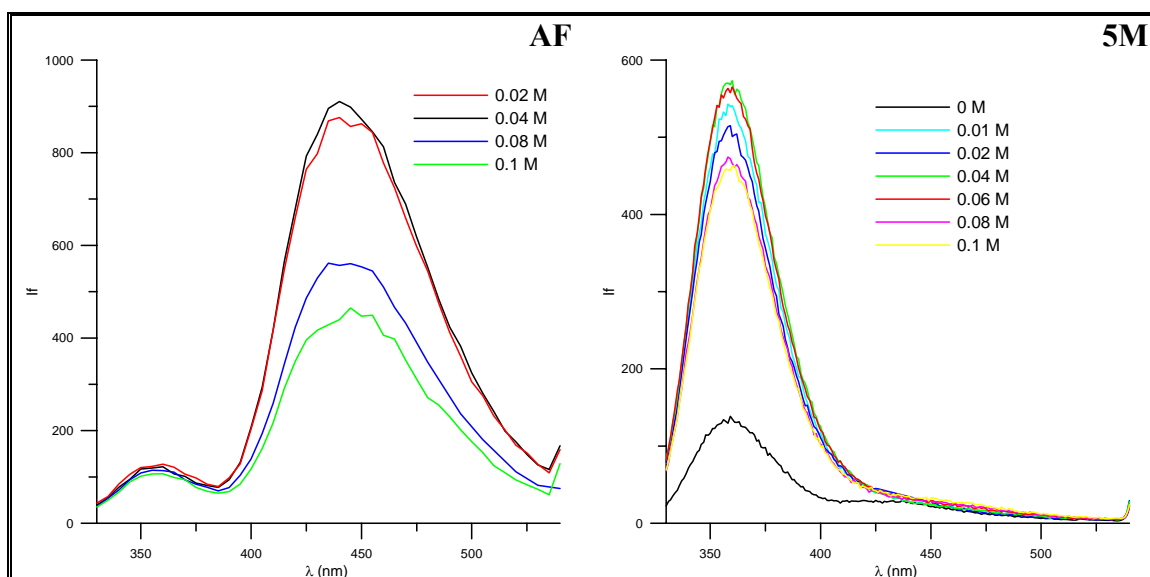


Figura V.18. Influencia de la concentración de disolución reguladora sobre los espectros de emisión de AF irradiado 20 minutos,  $[AF] = 0.3 \mu\text{g mL}^{-1}$  y de 5M sin irradiar,  $[5M] = 0.3 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Como podemos observar en las figuras anteriores, tanto la fluorescencia nativa del 5M como la del fotoproducto del AF, aumentan a medida que lo hace la concentración de tampón, alcanzándose la máxima señal para una concentración de tampón 0.04 M, para luego comenzar a disminuir. Además, se registraron las curvas cinéticas de ambas reacciones durante 20 minutos, encontrándose que son muy similares para los valores más bajos de concentración de tampón, viéndose desfavorecidas a partir de 0.08 M.

A la vista de estos resultados, seleccionamos como concentración óptima de disolución reguladora la de 0.04 M, que la conseguimos añadiendo 0.8 mL de la

disolución reguladora ácido acético/acetato sódico, 0.5 M, en un volumen final de disolución de 10 mL.

➤ *Influencia de la temperatura*

Para llevar a cabo el estudio sobre la influencia de esta variable, se prepararon disoluciones que, en un volumen final de 10 mL, contenían  $0.3 \mu\text{g mL}^{-1}$  de cada analito, 0.8 mL de disolución reguladora acético/acetato 0.5 M y agua destilada hasta enrase. Se registran las curvas cinéticas y los espectros de emisión, antes y después de irradiar, Figura V.19 y Figura V.20.

Observamos que las velocidades, tanto de formación del fotoproducto del AF como de fotodescomposición del 5M, aumentan con la temperatura (Figura V.19). Sin embargo, como podemos ver en la Figura V.20, tanto la señal de fluorescencia del fotoproducto del AF, como la señal inicial del 5M, disminuyen con la temperatura. Debido a esto, seleccionamos como temperatura de compromiso la de 15 °C.

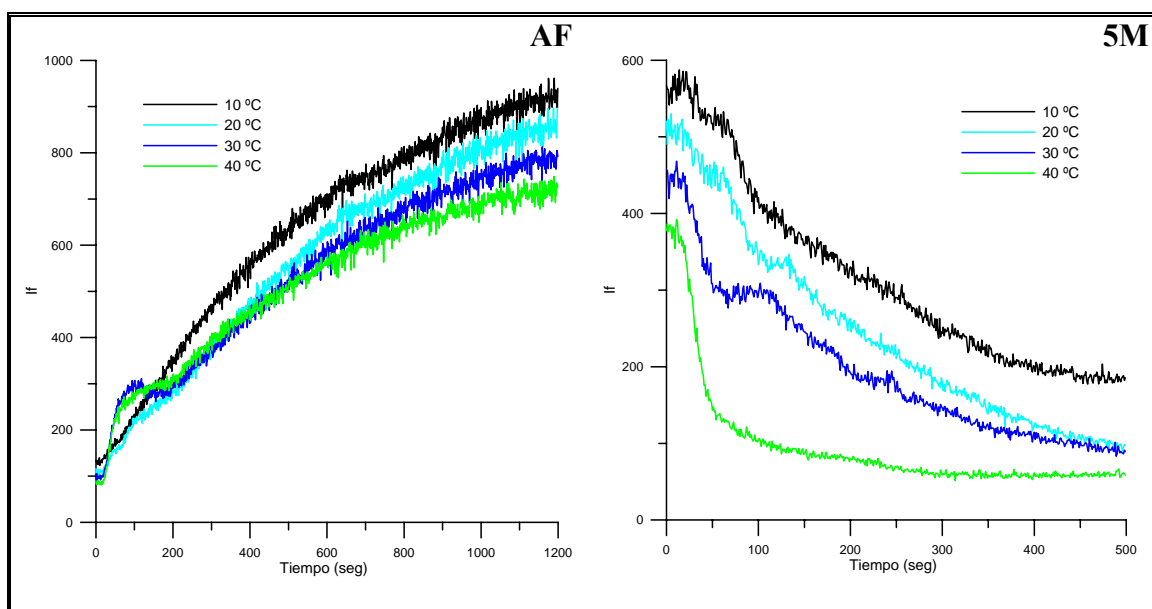


Figura V.19. Influencia de la temperatura sobre la velocidad de las fotorreacciones de AF y 5M.  $\lambda_{ex} = 275 \text{ nm}$ ,  $[AF] = 0.3 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $[5M] = 0.3 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 4$ .

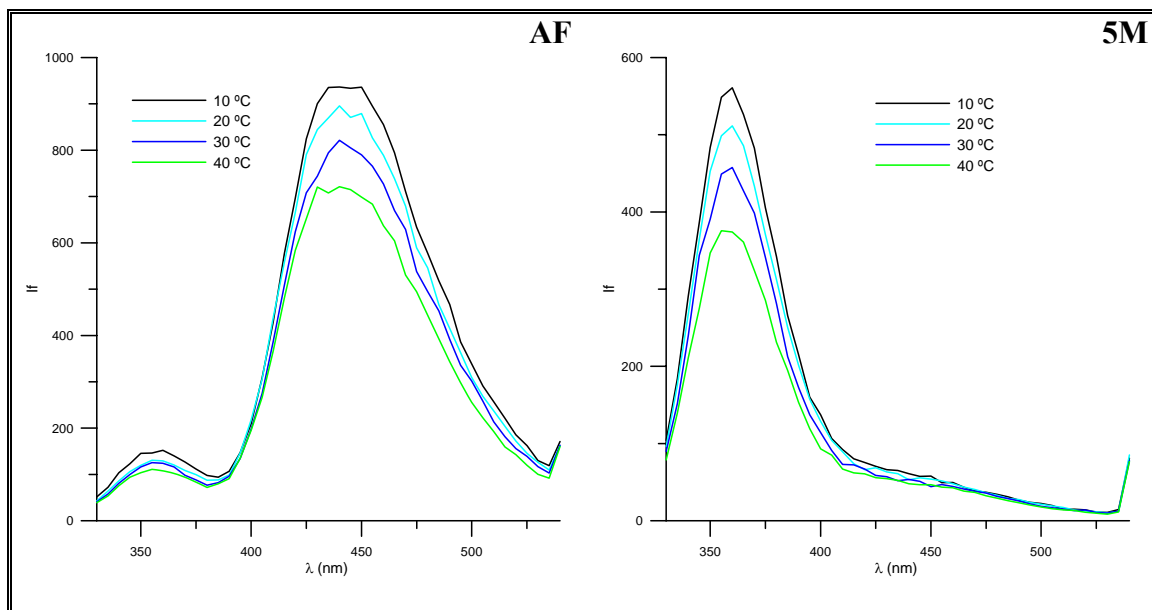


Figura V.20. Influencia de la temperatura sobre los espectros de emisión de disoluciones de AF irradiadas 20 minutos y de disoluciones de 5M sin irradiar.  $[AF] = 0.3 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $[5M] = 0.3 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

#### V.3.4. Rectas de calibrado

Optimizadas todas las variables físico-químicas e instrumentales, se estudió si existía linealidad entre las concentraciones de analito puestas y las señales de fluorescencia medidas de ambos analitos. Para ello, se registraron los espectros de emisión de disoluciones de AF, después de irradiar durante 20 minutos, y se midieron las intensidades de fluorescencia en el máximo de emisión del fotoproducto originado, 445 nm ( $\lambda_{\text{ex}} = 275$  nm). En el caso del 5M, se registraron los espectros de emisión de disoluciones sin irradiar, y se midieron las intensidades de fluorescencia en el máximo de emisión de este analito, 360 nm ( $\lambda_{\text{ex}} = 275$  nm). Para ambos analitos, el intervalo de concentraciones estudiado fue el comprendido entre 20 y 300 ng mL<sup>-1</sup>. En la Figura V.21 se muestran las rectas obtenidas.



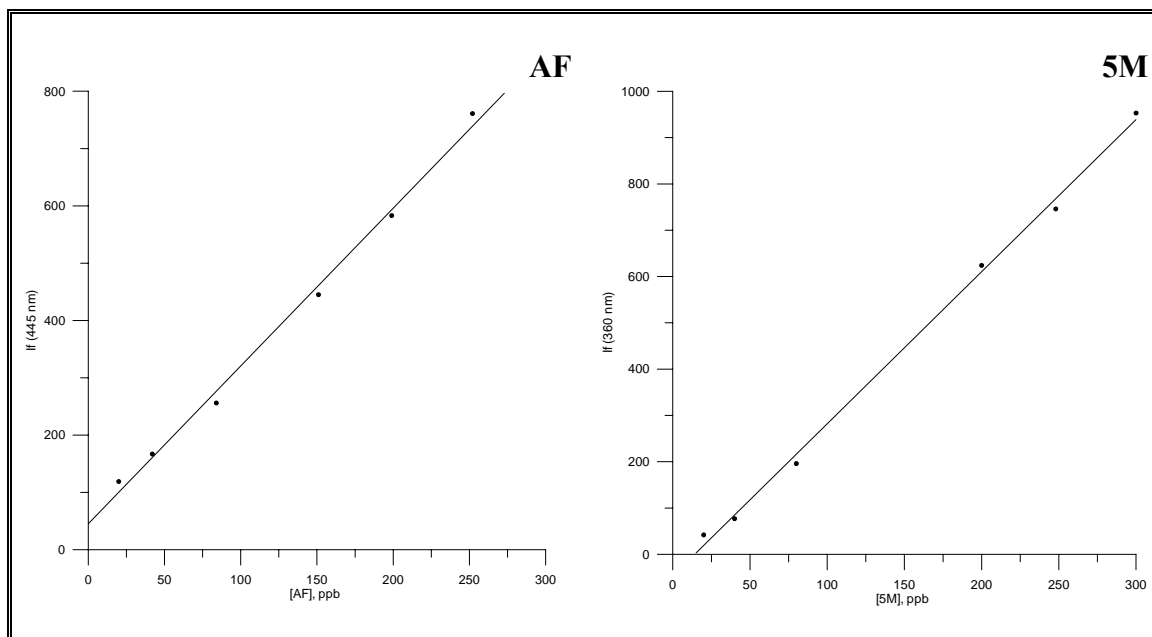


Figura V.21. Influencia de la concentración de AF y 5M en la señal de fluorescencia. pH 4, T = 15 °C,  $\lambda_{ex} = 275 \text{ nm}$ .

En ambos casos, se obtuvieron líneas rectas que se ajustan por el método de mínimos cuadrados, obteniéndose las ecuaciones que se recogen en la Tabla V.5. En esta misma tabla se presentan los valores de los coeficientes de determinación,  $R^2$  para cada una de las rectas, así como los límites de detección calculados.

Tabla V.5. Parámetros analíticos y estadísticos de las rectas de calibrado de AF y 5M.

	AF	5M
Intervalo Lineal (ng mL <sup>-1</sup> )	20 – 300	20 – 300
Ecuación de la recta	$y = 2.75x - 45.29$	$y = 3.28x - 46.35$
Coefficiente de determinación, $R^2$	0.9948	0.9975
Linealidad (%)	96	97
Sensibilidad analítica*, $\gamma^{-1}$ (ng mL <sup>-1</sup> )	7.4	6.6
LOD** (ng mL <sup>-1</sup> )	27.9	24.2
LOD*** (ng mL <sup>-1</sup> )	16.3	13.8

\* [48]

\*\* Clayton y col. ( $\alpha = \beta = 0.05$ ) [49]

\*\*\* Long y Winefordner ( $k = 3$ ) [50]

Una vez comprobado que, en las condiciones experimentales seleccionadas, existe una adecuada linealidad, vamos a intentar resolver esta mezcla con distintos métodos de calibración multivariante.

Debido a las diferencias espectrales entre ambos analitos, Figura V.4, no fue posible seleccionar unas longitudes de onda, de compromiso, para registrar las curvas cinéticas de evolución de la intensidad de fluorescencia con el tiempo de irradiación de ambos fotoproductos. Por lo tanto, no pudimos aplicar métodos de calibración multivariante de primer orden para determinar simultáneamente AF y 5M. Por este motivo, abordaremos la resolución de esta mezcla con métodos de calibración multivariante de segundo orden y, posteriormente, intentaremos realizar su determinación en suero.

### ***V.3.5. Resolución de la mezcla de AF y 5M empleando datos de segundo orden***

En primer lugar, intentaremos resolver esta mezcla empleando distintos algoritmos que nos permitan analizar datos de segundo orden, tales como U-PLS/RBL, N-PLS/RBL, PARAFAC, SWATLD y BLLS. Para ello, emplearemos el programa MVC2 (Multivariate Calibration for Second-Order).

Los datos de segundo orden que emplearemos serán obtenidos siguiendo la evolución de los espectros de emisión de fluorescencia con el tiempo de irradiación, en un intervalo de longitudes de onda comprendido entre 330 y 540 nm, excitando a 275 nm, tomando un punto cada 5 nm ( $J = 43$ ) y durante 20 minutos. Se registraba un espectro cada minuto ( $K = 20$ ), con lo que, finalmente, obteníamos una matriz emisión-tiempo con 860 puntos espectrales.

Para el registro de las matrices emisión-tiempo, se prepararon dos disoluciones independientes que contenían  $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$  de AF o de 5M, 0.8 mL de disolución

reguladora, HAc/NaAc 0.5 M y agua ultrapura hasta completar un volumen final de 10 mL. También se preparó otra disolución que contenía ambos analitos, en la misma concentración que las disoluciones independientes. De cada una de estas disoluciones se toma una alícuota de 2 mL con la que se llena el sistema y se lleva a cabo el registro de las matrices con el tiempo de irradiación, en las condiciones instrumentales antes señaladas.

En la Figura V.22 se muestra la evolución de los espectros de emisión ( $\lambda_{ex} = 275 \text{ nm}$ ) con el tiempo de irradiación de las tres disoluciones, observándose como la intensidad de fluorescencia del AF aumenta con el tiempo, en todo el intervalo de longitudes de onda ensayados, mientras que para el 5M disminuye. En la matriz correspondiente a la mezcla, se pueden observar simultáneamente ambas evoluciones.

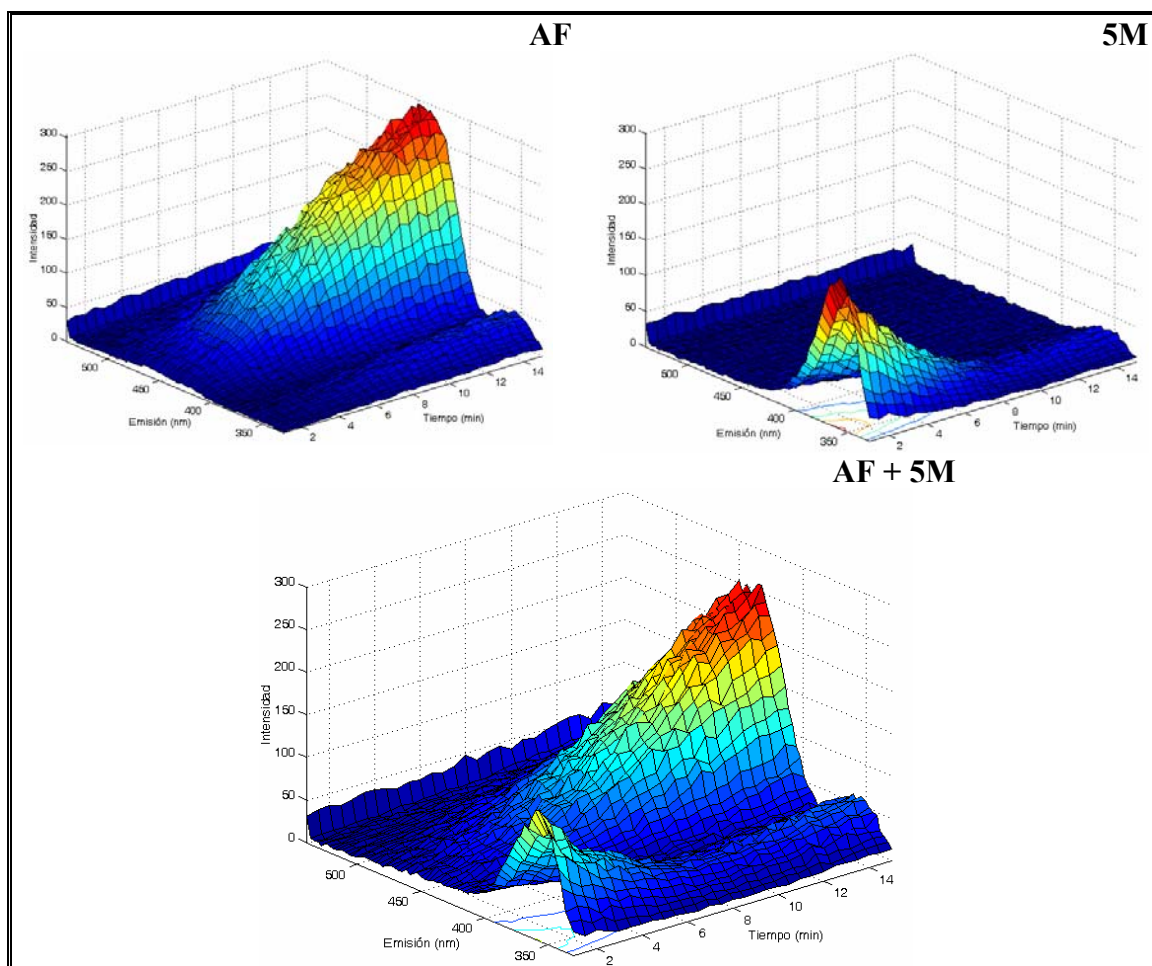


Figura V.22. Evolución de los espectros de emisión de fluorescencia con el tiempo de irradiación de disoluciones de AF, 5M y de una mezcla de ambos analitos.

Antes de proceder al diseño de la matriz de calibración, se comprueba si existe aditividad entre las señales, puesto que algunos de los métodos de calibración multivariante que vamos emplear exigen que se cumpla esta condición. Para ello, vamos a utilizar los espectros de emisión de ambos analitos y de una mezcla de ambos, a distintos tiempos de irradiación, comparándose los valores de intensidad de fluorescencia obtenidos para los espectros suma de los componentes individuales con las señales del espectro de la mezcla.

En la Figura V.23 se muestran los mapas de contorno de la evolución de los espectros de emisión con el tiempo de disoluciones independientes que contenían  $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$  de AF y  $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$  de 5M, así como de la disolución mezcla de ambos analitos. En dichas figuras, se han indicado los valores de intensidad de fluorescencia a tiempo inicial, medio (10 min) y final (20 min), de irradiación. Podemos ver cómo se cumple la aditividad de las señales a tiempo inicial, donde las señales de fluorescencia de las muestras son 40 unidades para AF, 29 unidades para 5M y 68 unidades para la mezcla. Resultados semejantes se obtienen para tiempos medio y final de reacción.

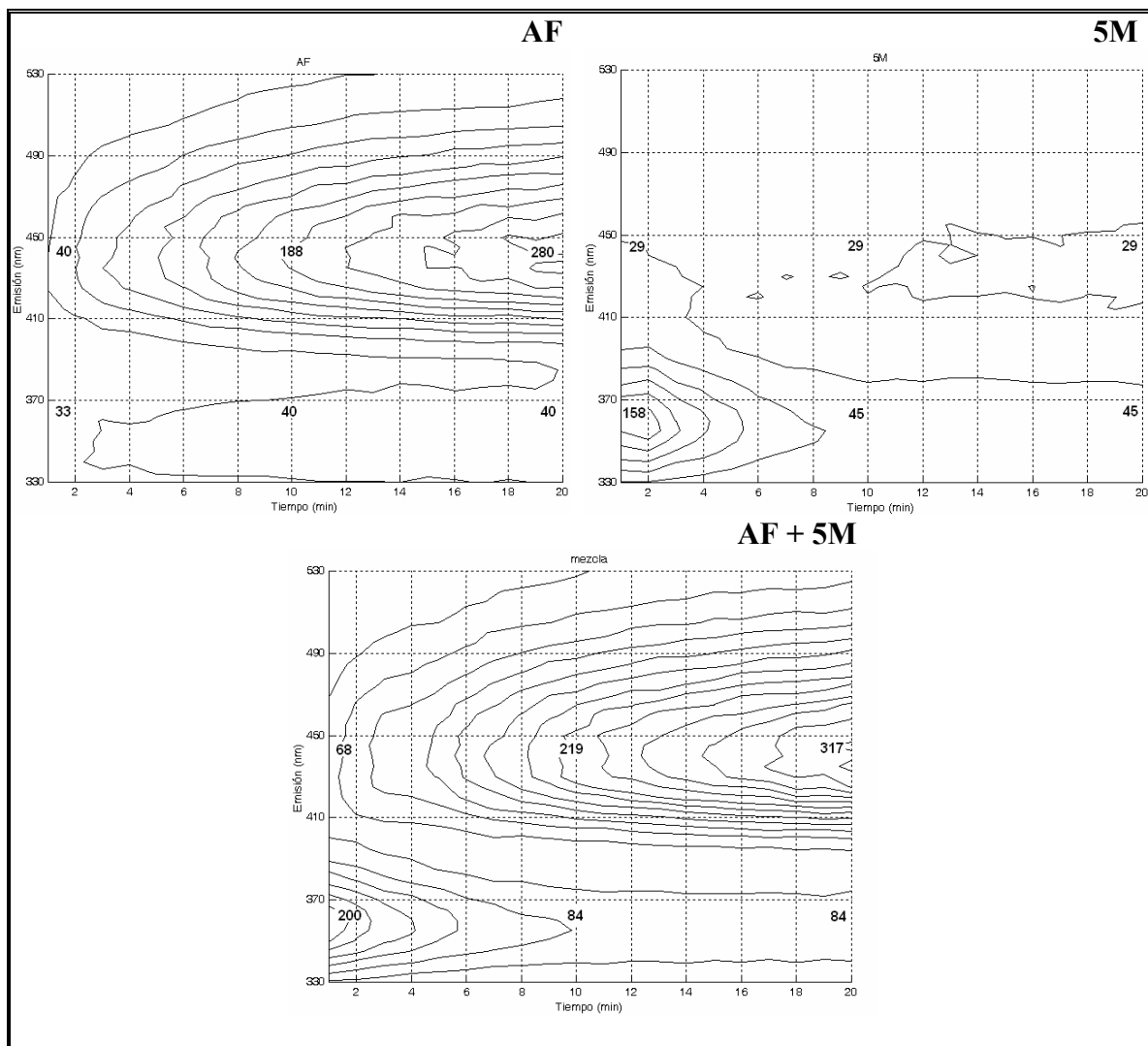


Figura V.23. Mapas de contorno de las matrices emisión-tiempo de irradiación de disoluciones de AF, 5M y de una mezcla de ambos.

### V.3.6. Matriz de calibración y validación del conjunto de predicción

Para la construcción de la matriz de calibración del modelo, se siguió un diseño que combina el diseño factorial con tres niveles y el diseño central compuesto, con lo que el número total de muestras necesarias para construir el modelo es trece (P1-P13). El intervalo de concentraciones empleadas para cada analito fue de 0-200 ng mL<sup>-1</sup>. Los valores de concentración empleados se muestran en la Tabla V.6.

*Tabla V.6. Composición de la matriz de calibración.*

<b>PATRONES</b>	<b>[AF], ng mL<sup>-1</sup></b>	<b>[5M], ng mL<sup>-1</sup></b>
P1	30	30
P2	30	100
P3	30	171
P4	100	30
P5	100	100
P6	100	171
P7	171	30
P8	171	100
P9	171	171
P10	100	0
P11	100	200
P12	0	100
P13	200	100

También se prepararon un total de siete muestras formadas por mezclas binarias (T2 - T7), de concentraciones de cada analito diferentes a las empleadas para la calibración, pero dentro de los mismos intervalos de concentraciones, así como un blanco (T1). Este grupo de muestras recogido en la Tabla V.7 será utilizado para validar el modelo.

*Tabla V.7. Composición del conjunto de validación.*

<b>MUESTRA</b>	<b>[AF], ng mL<sup>-1</sup></b>	<b>[5M], ng mL<sup>-1</sup></b>
T1	0	0
T2	106	148
T3	42	132
T4	84	160
T5	76	132
T6	134	96
T7	140	172

➤ **Calibración multivariante empleando N-PLS y U-PLS**

Como hemos indicado anteriormente, se registra la evolución de los espectros de emisión, en un intervalo de longitudes de onda comprendido entre 330 y 540 nm y durante un intervalo de tiempo de 20 minutos. En primer lugar, optimizamos el intervalo de longitudes de onda y de tiempo para realizar este estudio, seleccionando aquellos que nos proporcionen el mejor coeficiente de determinación,  $R^2$ , y PRESS (Prediction Residual Error Sum of Squares, suma de los cuadrados de los errores residuales de predicción).

Una vez analizados diferentes intervalos de longitudes de onda y tiempos de irradiación, los mejores parámetros estadísticos se resumen en la Tabla V.8.

*Tabla V.8. Intervalos óptimos y parámetros estadísticos de los modelos N-PLS y U-PLS para cada analito.*

<b>A* = 2</b>	<b>Intervalos**</b>	<b>N-PLS</b>		<b>U-PLS</b>	
		<b>PRESS</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>PRESS</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
<b>AF</b>	415-500 nm 1-20 min	2.97x10 <sup>2</sup>	0.999	3.11x10 <sup>2</sup>	0.999
<b>5M</b>	330-390 nm 1-20 min	6.86x10 <sup>2</sup>	0.996	6.88x10 <sup>2</sup>	0.997

\* A = n° de factores

\*\*  $\Delta\lambda = 5$  nm,  $\Delta t = 1$  min

Como podemos ver en la tabla anterior, los valores de PRESS y  $R^2$  son algo más favorables en el caso del AF.

Al aplicar los algoritmos N-PLS y U-PLS, se realizó validación cruzada para el conjunto de patrones de calibración y, de acuerdo con el criterio de Haaland y Thomas [51], se obtuvo un número óptimo de factores igual a 2, valor lógico teniendo en cuenta que estamos estudiando la mezcla de dos analitos en una matriz acuosa.

Una vez optimizado el modelo de calibración, se realiza la etapa de validación utilizando el conjunto de muestras de la Tabla V.7. En la Tabla V.9 se muestran las recuperaciones obtenidas con ambos modelos para cada uno de los analitos.

Tabla V.9. Predicciones obtenidas al aplicar N-PLS y U-PLS a la determinación de AF y 5M en muestras sintéticas.

Puesto (ng mL <sup>-1</sup> )	AF				Puesto (ng mL <sup>-1</sup> )	5M			
	N-PLS	Encontrado, (ng mL <sup>-1</sup> )		% R		N-PLS	Encontrado, (ng mL <sup>-1</sup> )		% R
0	4	-	4	-	0	6	-	6	-
106	101	95	101	95	148	167	113	167	113
42	40	96	41	97	132	122	92	122	92
84	83	99	83	99	160	163	102	163	102
76	83	110	84	110	132	122	93	122	93
134	123	92	124	92	96	97	101	97	101
140	153	109	153	109	172	160	93	160	93
Promedio ± SD	<b>100 ± 8</b>		<b>100 ± 7</b>		Promedio ± SD	<b>99 ± 8</b>		<b>99 ± 8</b>	
REP <sup>a</sup> , %	<b>7.8</b>		<b>7.6</b>		REP <sup>a</sup> , %	<b>8.7</b>		<b>8.7</b>	
RMSEP <sup>b</sup>	<b>7.7</b>		<b>7.5</b>		RMSEP <sup>b</sup>	<b>10.4</b>		<b>10.4</b>	

<sup>a</sup>REP, %: Error relativo de predicción, calculado como  $100 \times \text{RMSEP} / \bar{C}$ , siendo  $\bar{C}$  la concentración media.

<sup>b</sup>RMSEP: Raíz cuadrada de la media de los errores de predicción al cuadrado.

$$\text{RMSEP} = \sqrt{\frac{1}{(I-1) \cdot \sum_1^I (C_{act} - C_{pred})^2}}, \text{ siendo } I=7.$$

Los valores de recuperación obtenidos para el AF y 5M son similares con ambos algoritmos, siendo los parámetros estadísticos algo mejores en el caso del AF.

Compararemos los valores de concentración predichos por cada método con el valor teórico, con objeto de averiguar si existen diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95 %. Para ello, aplicaremos el test de la elipse, EJCR. Como podemos ver en la Figura V.24, el punto teórico de pendiente 1 y



ordenada en el origen 0 se encuentra dentro del área delimitada por ambas elipses, lo que indica que no difieren de los valores calculados al representar las concentraciones teóricas frente a las predichas, para un nivel de confianza del 95 %, o lo que es lo mismo, no existen diferencias estadísticamente significativas, al nivel de confianza elegido, entre las concentraciones teóricas y predichas para los dos analitos por ambos métodos. Además, podemos observar, que en ambos métodos el tamaño de las elipses del AF es menor que las del 5M, lo que indica una menor dispersión de los resultados encontrados para este analito y, por tanto, una mayor precisión de ambos métodos para el AF.

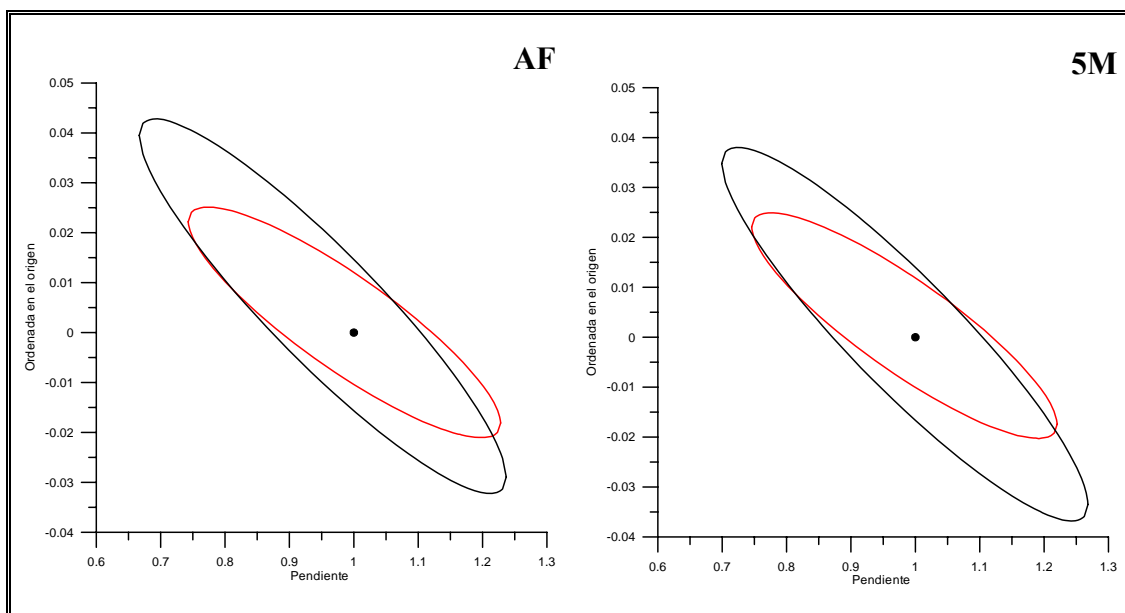


Figura V.24. EJCR (95 % de confianza) para la pendiente y la ordenada en el origen de las regresiones de la concentración teórica frente a la predicha de AF (—) y 5M (—) empleando N-PLS y U-PLS.

➤ **Calibración multivariante empleando PARAFAC y SWATLD**

En primer lugar, se estudió el intervalo de los sensores para realizar las determinaciones, observándose, de nuevo, que mejoraban los resultados obtenidos empleando los intervalos optimizados anteriormente.

La determinación del número óptimo de factores en PARAFAC se realizó en función del Core Consistency Diagnostic (CORCONDIA). Se analizaron todas las muestras del conjunto de validación, encontrando un número óptimo de factores de 2, como puede observarse en la Figura V.25, para el caso de la muestra T2.

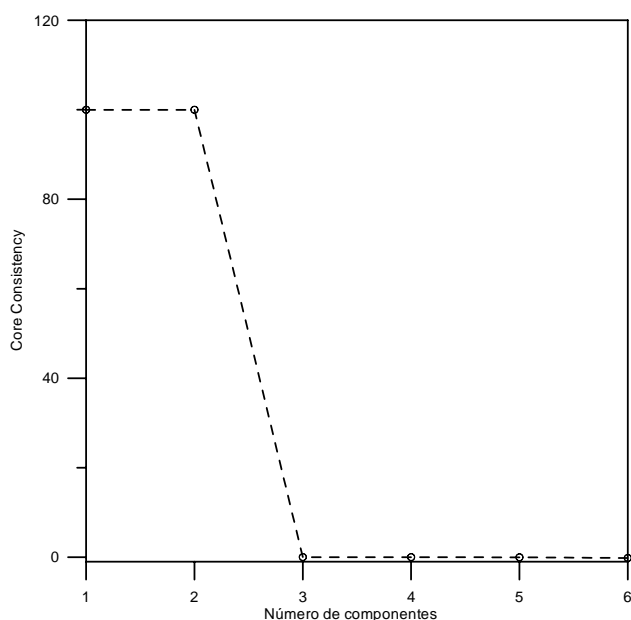


Figura V.25. Representación del Core Consistency en función del número de factores para la muestra T2.

Como se indicó en el Capítulo II, aunque SWATLD es menos sensible que PARAFAC a la utilización de un exceso de factores en el proceso de cálculo, también se empleó con un número de factores de 2.

En la Figura V.26 se muestran los perfiles de emisión y los perfiles cinéticos que se obtienen al procesar la muestra T2, junto con el conjunto de calibración y tras aplicar

PARAFAC (A) y SWATLD (B), empleando un número de factores igual a 2 en ambos casos.

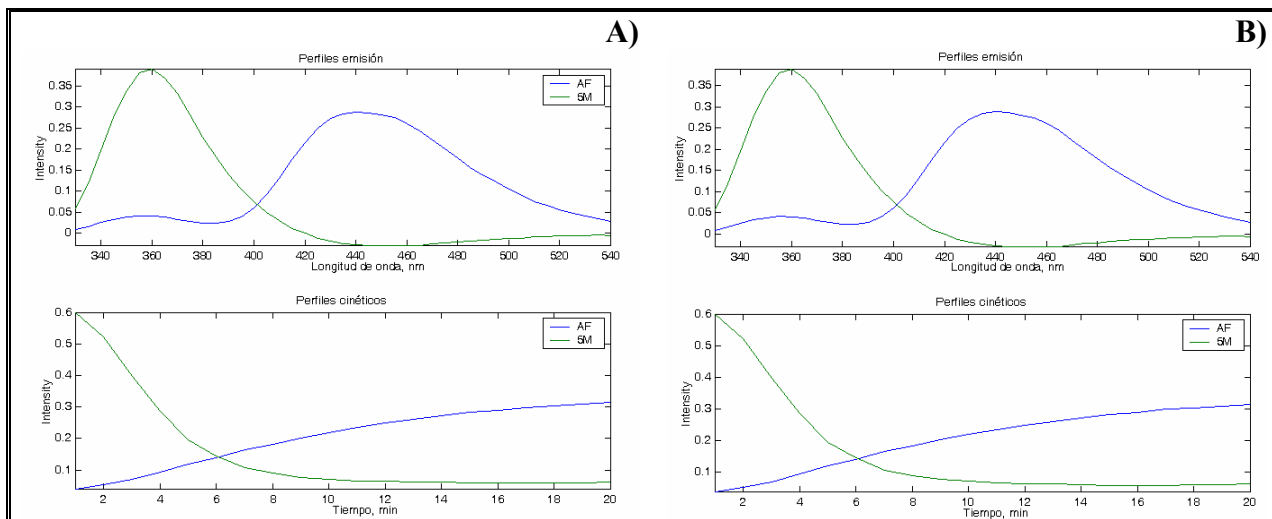


Figura V.26. Perfiles de la muestra T2 obtenidos al aplicar PARAFAC (A) y SWATLD (B).

En las Tablas V.10 y V.11, se recogen las recuperaciones obtenidas del análisis del conjunto de validación con los dos algoritmos, así como los parámetros de calidad de ambos métodos. Podemos observar que al aplicar SWATLD obtenemos mejores valores de REP para el 5M, al igual que ocurría con PARAFAC y, podemos concluir, que los resultados obtenidos al aplicar ambos métodos son muy similares para ambos analitos, mejorando ligeramente los resultados en el caso de PARAFAC.

Tabla V.10. Predicciones obtenidas al aplicar PARAFAC.

AF			5M		
Puesto (ng mL <sup>-1</sup> )	Encontrado (ng mL <sup>-1</sup> )	% R	Puesto (ng mL <sup>-1</sup> )	Encontrado (ng mL <sup>-1</sup> )	% R
0	3	-	0	13	-
106	91	86	148	165	112
42	46	109	132	129	98
84	89	106	160	155	97
76	86	110	132	126	96
134	139	104	96	96	100
140	146	104	172	173	101
Promedio $\pm$ SD		<b>103 <math>\pm</math> 9</b>	Promedio $\pm$ SD		<b>101 <math>\pm</math> 6</b>
RMSEP		<b>7.9</b>	RMSEP		<b>8.7</b>
REP, %		<b>9.5</b>	REP, %		<b>7.2</b>

Tal como se observa en la tabla, al aplicar PARAFAC los resultados son satisfactorios para ambos analitos, aunque obtenemos mejores REP para el 5M.

Tabla V.11. Predicciones obtenidas al aplicar SWATLD.

AF			5M		
Puesto (ng mL <sup>-1</sup> )	Encontrado (ng mL <sup>-1</sup> )	% R	Puesto (ng mL <sup>-1</sup> )	Encontrado (ng mL <sup>-1</sup> )	% R
0	4	-	0	13	-
106	95	90	148	170	115
42	38	90	132	128	97
84	82	98	160	169	106
76	76	100	132	121	92
134	116	87	96	101	105
140	146	104	172	170	99
Promedio $\pm$ SD		<b>95 <math>\pm</math> 7</b>	Promedio $\pm$ SD		<b>102 <math>\pm</math> 8</b>
RMSEP		<b>8.6</b>	RMSEP		<b>11.3</b>
REP, %		<b>10.3</b>	REP, %		<b>9.4</b>

De nuevo, aplicamos el test de la elipse para comparar las concentraciones teóricas, frente a las predichas para cada analito, al aplicar PARAFAC y SWATLD, Figura V.27.

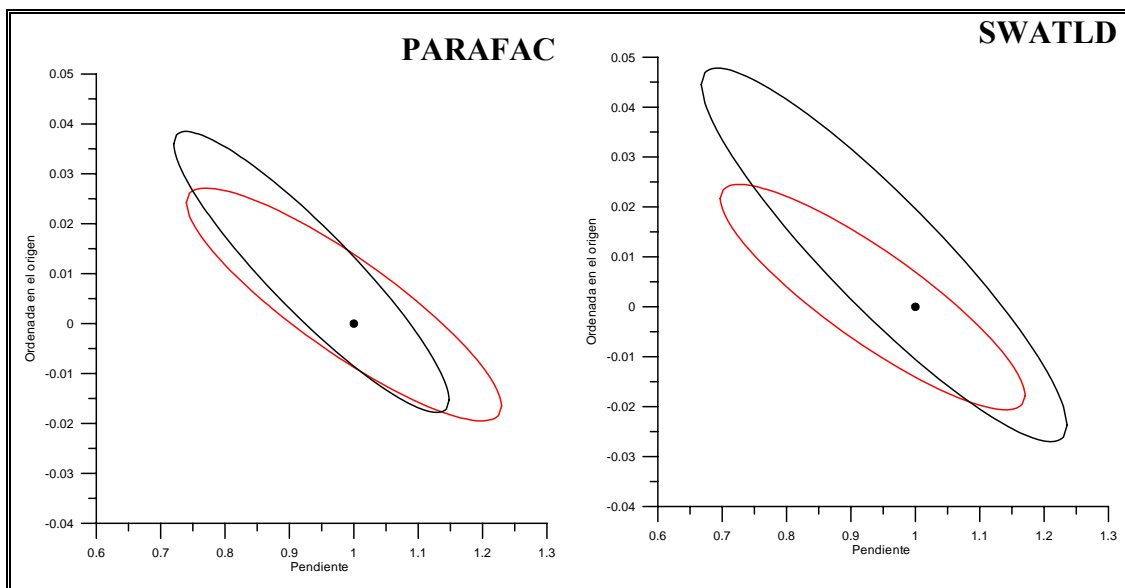


Figura V.27. EJCR (95 % de confianza) para la pendiente y la ordenada en el origen de las regresiones de la concentración teórica frente a la predicha de AF (—) y 5M (—) empleando PARAFAC y SWATLD.

En la figura anterior, podemos ver que el punto teórico (1,0) está dentro de las áreas delimitadas por las elipses del AF y del 5M para ambos métodos, lo que nos indica que no hay diferencias significativas entre las concentraciones teóricas y las predichas, para el 95 % de confianza. Sin embargo, el tamaño de las elipses, sobre todo para el 5M, es menor con PARAFAC, lo que indica mayor precisión.

➤ **Calibración multivariante empleando BLLS**

Finalmente, aplicaremos el método de calibración multivariante de segundo orden BLLS que, al igual que los dos anteriores, dispone de la *ventaja de segundo orden*.

En primer lugar, estudiamos el intervalo de los sensores para realizar las determinaciones, observándose en este caso que obteníamos mejores recuperaciones y errores de regresión inferiores empleando el intervalo completo, tanto de longitudes de onda como de tiempos, para ambos analitos.

La determinación del número óptimo de factores se realizó analizando la variación del *error de regresión*, que se obtiene al representar la concentración teórica de cada analito, en las muestras del conjunto de calibración, en función de la concentración predicha por el modelo. De nuevo encontramos un número óptimo de factores igual a 2, como puede observarse en la Figura V.28 para el caso de la muestra T2.

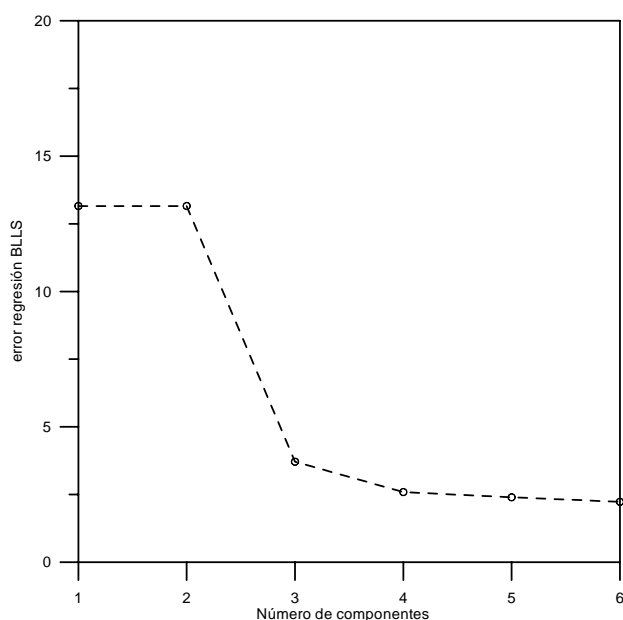


Figura V.28. Representación del error de regresión con BLLS en función del número de factores para la muestra T2.

Los perfiles obtenidos con BLLS se muestran en la Figura V.29 y, en la Tabla V.12, se recogen las recuperaciones obtenidas del análisis del conjunto de validación, así como los parámetros de calidad del método.

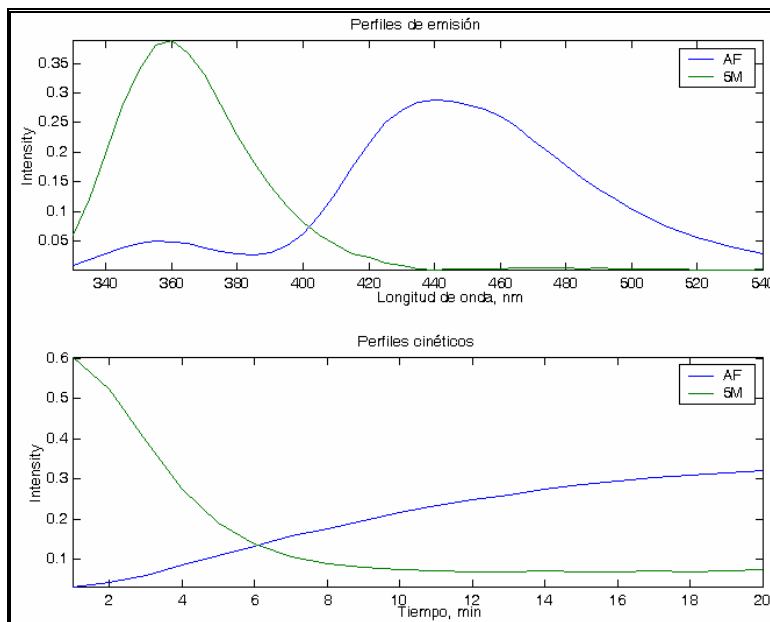


Figura V.29. Perfiles de la muestra T2 obtenidos al aplicar BLLS.

En la Tabla V.12 observamos que las recuperaciones son mejores para el 5M, así como el valor de REP obtenido.

Tabla V.12. Predicciones obtenidas al aplicar BLLS.

AF			5M		
Puesto (ng mL <sup>-1</sup> )	Encontrado (ng mL <sup>-1</sup> )	% R	Puesto (ng mL <sup>-1</sup> )	Encontrado (ng mL <sup>-1</sup> )	% R
0	1	-	0	12	-
106	84	79	148	168	114
42	29	69	132	123	93
84	84	100	160	165	103
76	75	99	132	125	95
134	112	84	96	99	103
140	139	99	172	170	99
Promedio ± SD		<b>86 ± 13</b>	Promedio ± SD		<b>101 ± 7</b>
RMSEP		<b>12.8</b>	RMSEP		<b>10.1</b>
REP, %		<b>15.3</b>	REP, %		<b>8.4</b>

Al aplicar el test de la elipse, Figura V.30, encontramos que no había diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones teóricas y las predichas por este método, para ambos analitos, para un nivel de confianza del 95 %.

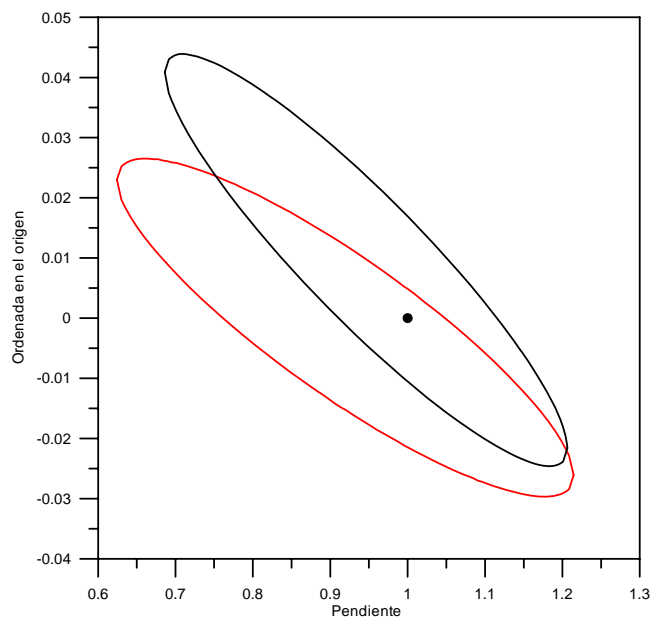


Figura V.30. EJCR (95 % de confianza) para la pendiente y la ordenada en el origen de las regresiones de la concentración teórica frente a la predicha de AF (—) y 5M (—) empleando BLLS.



En la Figura V.31 se muestra un diagrama comparativo de los valores de recuperación calculados mediante la aplicación de los diferentes algoritmos, N-PLS, U-PLS, PARAFAC, SWATLD y BLLS, para cada componente.

Para el AF y 5M, todos los algoritmos proporcionan resultados aceptables. Siendo, en general, más precisos los obtenidos para el AF. En cuanto al 5M, PARAFAC proporciona los mejores resultados.

A la vista de los resultados expuestos, podemos concluir que los métodos de calibración multivariante de segundo orden empleados resuelven satisfactoriamente este problema en muestras acuosas, por lo que abordaremos su determinación en muestras de suero.

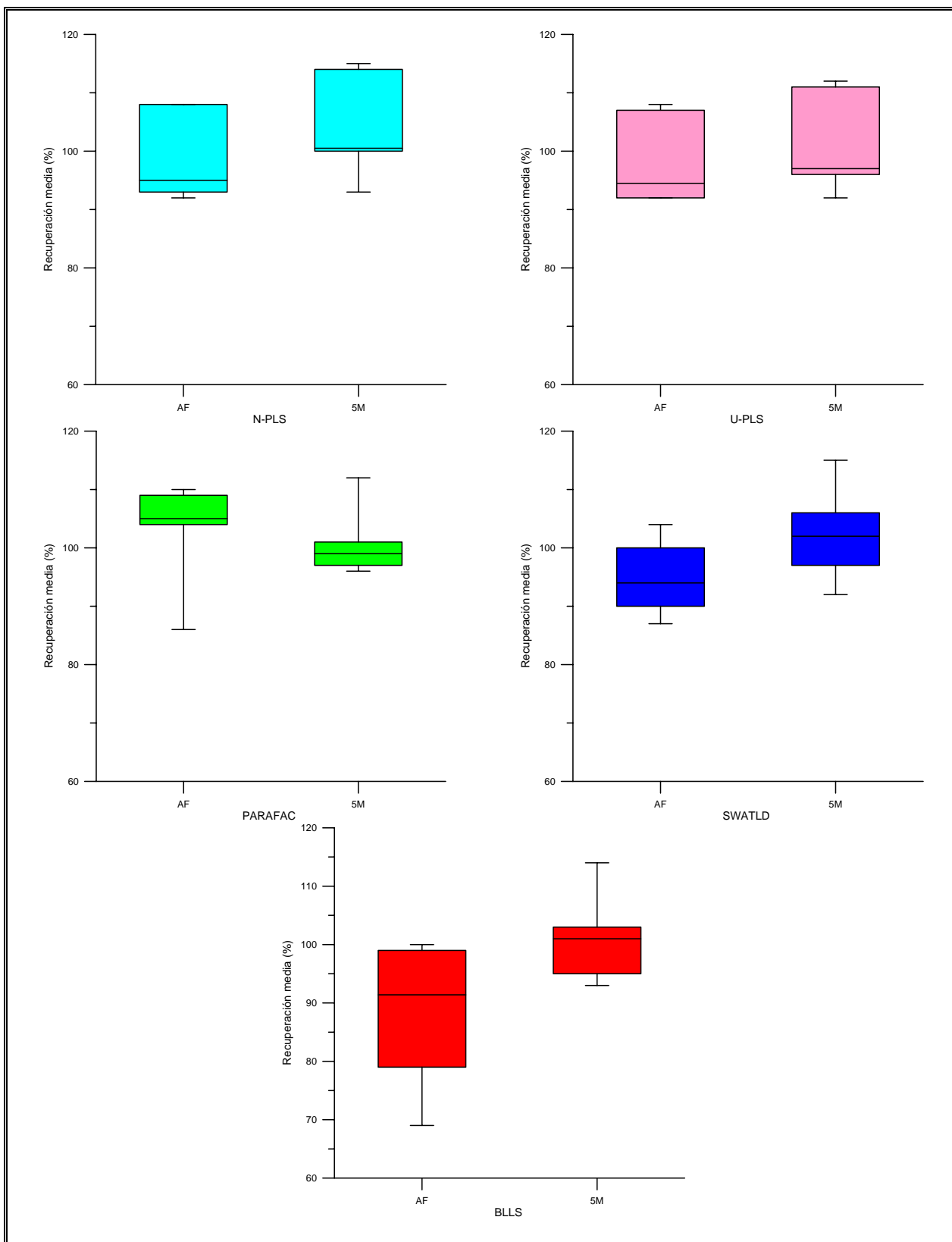


Figura V.31. Diagrama comparativo de los valores de recuperación calculados por los diferentes métodos ensayados en el análisis de muestras sintéticas.

### V.3.7. Determinación de AF y 5M en muestras de suero

Una vez comprobado que los métodos propuestos son apropiados para resolver problemas sintéticos en disolución acuosa, vamos a aplicar estos métodos a la determinación de AF y su metabolito 5M en muestras de suero.

Para llevar a cabo esta aplicación, registramos las matrices de emisión-tiempo de las muestras de suero previamente contaminadas y calculamos las recuperaciones en cada una de ellas empleando los métodos N-PLS/RBL, U-PLS/RBL, PARAFAC, SWATLD y BLLS, ya que todos ellos disponen de la ventaja de segundo orden. Para ello, utilizaremos las matrices de emisión-tiempo de los patrones de concentración perfectamente conocida que se recogen en la Tabla V.6.

Antes de efectuar la predicción de las muestras de suero, éstas se someten a un proceso de desproteneización, siguiendo un procedimiento propuesto por E. Schleyer y *col.* [52]. El procedimiento seguido fue el siguiente:

1. Se toma 1 mL de suero al que se le añaden diferentes cantidades de AF y 5M y 0.1 mL de ácido ascórbico (60 mg/mL) y se diluyen hasta 3 mL.
2. A una alícuota de 1 mL de la disolución anterior, se le añade 1.5 mL de acetonitrilo, con objeto de precipitar las proteínas del suero y se centrifuga la muestra durante 5 minutos.
3. Se toma el sobrenadante y se añaden 7 mL de cloroformo. Se agita y se dejan separar las fases.
4. Tomamos 30  $\mu$ L de la fase acuosa, que llevamos a un matraz de 3 mL, añadimos 0.24 mL de disolución reguladora HAc/NaAc 0.5 M y diluimos con agua ultrapura hasta enrase.

Siguiendo este procedimiento, la dilución total del suero es de 300 veces, lo que implica que, con el rango de calibración realizado, se determinará AF y 5M hasta una concentración de 60 mg L<sup>-1</sup>

En primer lugar, estudiamos la evolución de los espectros de emisión ( $\lambda_{\text{ex}} = 275$  nm) de una muestra de suero, al ser sometidas a la irradiación en las condiciones ya indicadas. La matriz emisión-tiempo de irradiación se recoge en la Figura V.32.

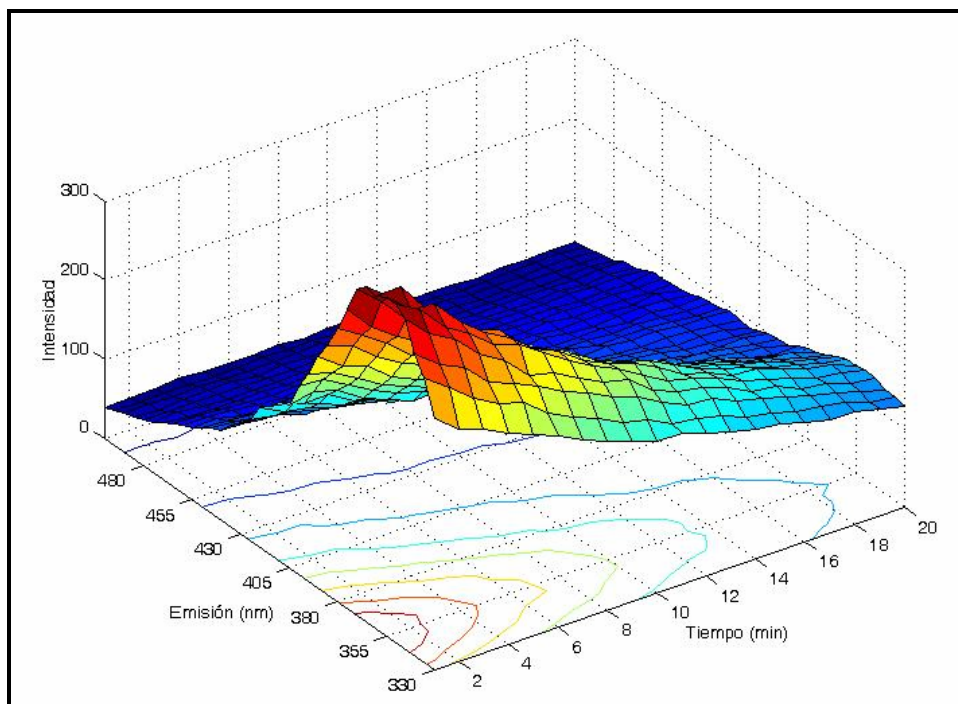


Figura V.32. Evolución de los espectros de emisión con el tiempo de irradiación de una muestra de suero.

Se observa que el suero presenta un máximo de emisión a 355 nm, cuya intensidad de fluorescencia disminuye con el tiempo de irradiación, sin llegar a desaparecer durante los 20 minutos en los que estamos recogiendo datos.

Se procedió a analizar las muestras de suero enriquecido, y los resultados se evaluaron con todos los algoritmos estudiados que presentan la ventaja de segundo orden, N-PLS/RBL, U-PLS/RBL, PARAFAC, SWATLD y BLLS.

En presencia de suero, es necesario volver a optimizar el número de factores y los sensores para cada analito. En el caso de N-PLS y U-PLS, acoplados a RBL, además de los 2 factores necesarios para realizar el análisis en muestras acuosas, se necesitó

considerar un componente más como interferente, al emplear el procedimiento RBL, cuando se analizaron las muestras en suero. En la Figura V.33 se muestra la variación de los residuos de predicción ( $sr$ ) en función del número de interferentes ( $N_{int}$ ).

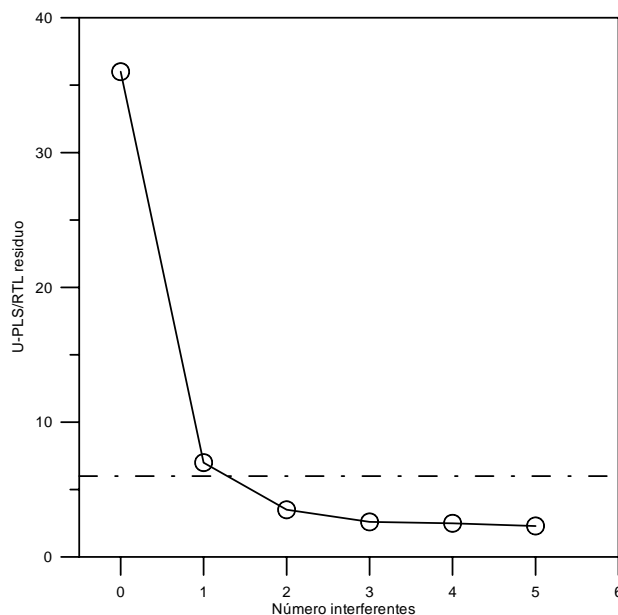


Figura V.33. Representación de los residuos de predicción ( $sr$ ) en función del número de interferentes ( $N_{int}$ ) para la muestra de suero 2, que contiene  $100 \text{ ng mL}^{-1}$  de AF y  $111 \text{ ng mL}^{-1}$  de 5M. El nivel de ruido en este sistema es de 6 unidades relativas de fluorescencia (- · - · - · - · - · - · -).

Con los demás algoritmos empleados, también se empleó un número de factores igual a 3 y, en el caso del AF, los mejores resultados se encontraron empleando el intervalo completo, tanto de longitudes de onda como de tiempo, mientras que para el 5M mejoraban los resultados empleando el intervalo optimizado anteriormente. Los perfiles obtenidos al aplicar PARAFAC a una muestra de suero contaminada con  $187 \text{ ng mL}^{-1}$  de AF y  $50 \text{ ng mL}^{-1}$  de 5M se muestran en la Figura V.34.

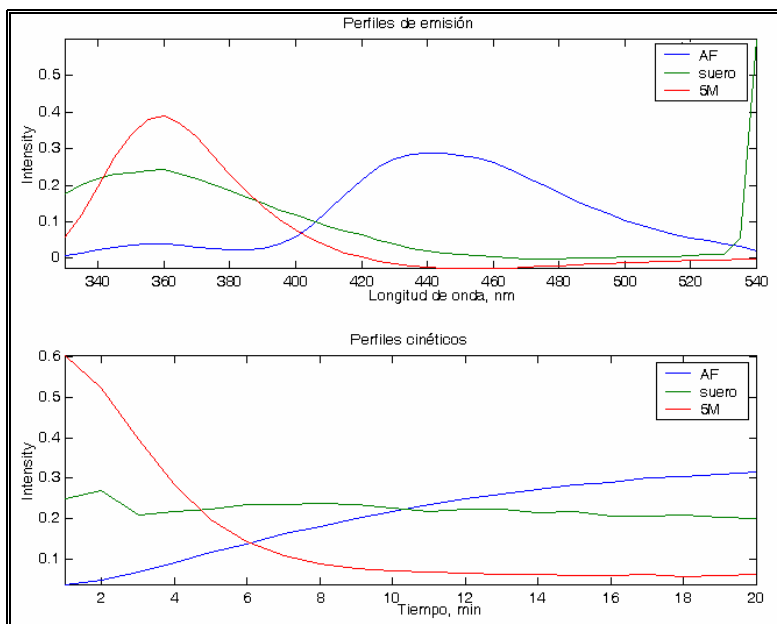


Figura V.34. Perfiles de una muestra de suero contaminada al aplicar PARAFAC.

Cada ensayo se realizó por duplicado y, las recuperaciones obtenidas en cada caso y aplicando cada método, se resumen en las Tablas V.13, V.14, V.15 y V.16.

Tabla V.13. Recuperaciones obtenidas al aplicar N-PLS/RBL y U-PLS/RBL en muestras de suero contaminadas.

Puesto (ng mL <sup>-1</sup> )	AF				Puesto (ng mL <sup>-1</sup> )	5M			
	N-PLS RBL	% R	U-PLS RBL	% R		N-PLS RBL	% R	U-PLS RBL	% R
0	2	-	3	-	0	8	-	5	-
100	87	87	88	88	111	79	71	79	71
50	56	112	55	110	50	61	122	60	120
150	158	105	155	103	150	153	102	151	101
105	81	77	78	74	100	96	96	98	98
101	81	80	80	79	100	82	82	87	87
101	106	105	105	104	50	57	114	58	116
77	74	96	72	94	53	54	102	56	106
Promedio ± SD	<b>95 ± 13</b>		<b>93 ± 13</b>		Promedio ± SD	<b>98 ± 17</b>		<b>100 ± 17</b>	
RMSEP	<b>12.7</b>		<b>13.3</b>		RMSEP	<b>14.2</b>		<b>13.2</b>	
REP, %	<b>14.8</b>		<b>15.5</b>		REP, %	<b>18.5</b>		<b>17.2</b>	

En la tabla anterior podemos observar que los valores obtenidos con N-PLS/RBL y U-PLS/RBL son muy similares para ambos analitos. Respecto a los valores de REP, son algo más favorables en el caso del AF.

Tabla V.14. Recuperaciones obtenidas al aplicar PARAFAC en muestras de suero contaminadas.

Puesto (ng mL <sup>-1</sup> )	AF		Puesto (ng mL <sup>-1</sup> )	5M	
	Encontrado (ng mL <sup>-1</sup> )	% R		Encontrado (ng mL <sup>-1</sup> )	% R
0	4.9	-	0	12	-
100	74	74	111	124	112
50	41	82	50	49	99
150	84	56	150	176	117
105	81	77	100	82	82
101	90	89	100	120	120
101	110	109	50	42	84
77	69	90	53	58	109
Promedio ± SD	<b>82 ± 16</b>		Promedio ± SD	<b>103 ± 15</b>	
RMSEP	<b>27.3</b>		RMSEP	<b>15.0</b>	
REP, %	<b>32.0</b>		REP, %	<b>19.6</b>	

Tabla V.15. Recuperaciones obtenidas al aplicar SWATLD en muestras de suero contaminadas.

AF			5M		
Puesto (ng mL <sup>-1</sup> )	Encontrado (ng mL <sup>-1</sup> )	% R	Puesto (ng mL <sup>-1</sup> )	Encontrado (ng mL <sup>-1</sup> )	% R
0	5	-	0	5	-
100	74	74	111	72	72
50	56	112	50	48	96
150	140	93	150	154	103
105	75	71	100	85	85
101	86	85	100	83	83
101	109	108	50	35	70
77	79	103	53	48	91
Promedio ± SD		<b>92 ± 16</b>	Promedio ± SD		<b>86 ± 12</b>
RMSEP		<b>15.9</b>	RMSEP		<b>17.1</b>
REP, %		<b>18.6</b>	REP, %		<b>22.3</b>

Podemos observar que, al aplicar PARAFAC, obtenemos mejores recuperaciones para el 5M, mientras que, al aplicar SWATLD, se obtienen resultados ligeramente mejores para el AF.

Tabla V.16. Recuperaciones obtenidas al aplicar BLLS en muestras de suero contaminadas.

AF			5M		
Puesto (ng mL <sup>-1</sup> )	Encontrado (ng mL <sup>-1</sup> )	% R	Puesto (ng mL <sup>-1</sup> )	Encontrado (ng mL <sup>-1</sup> )	% R
0	12	-	0	6.9	-
100	67	67	111	124	112
50	34	68	50	49	98
150	96	64	150	154	103
105	67	64	100	95	95
101	78	77	100	115	115
101	97	96	50	44	88
77	57	74	53	55	104
Promedio ± SD		<b>73 ± 11</b>	Promedio ± SD		<b>102 ± 9</b>
RMSEP		<b>29.1</b>	RMSEP		<b>8.1</b>
REP, %		<b>34.1</b>	REP, %		<b>10.5</b>



Al aplicar BLLS, obtenemos mejores recuperaciones para el 5M, lo mismo que ocurría con PARAFAC. Con este algoritmo, obtenemos los peores valores de REP (%) para el AF, mientras que para el 5M ocurre lo contrario.

En la Figura V.35 se representan las elipses obtenidas al comparar los valores de la concentración puesta frente a la encontrada, en muestras de suero, para el AF y el 5M, con los cinco algoritmos empleados.

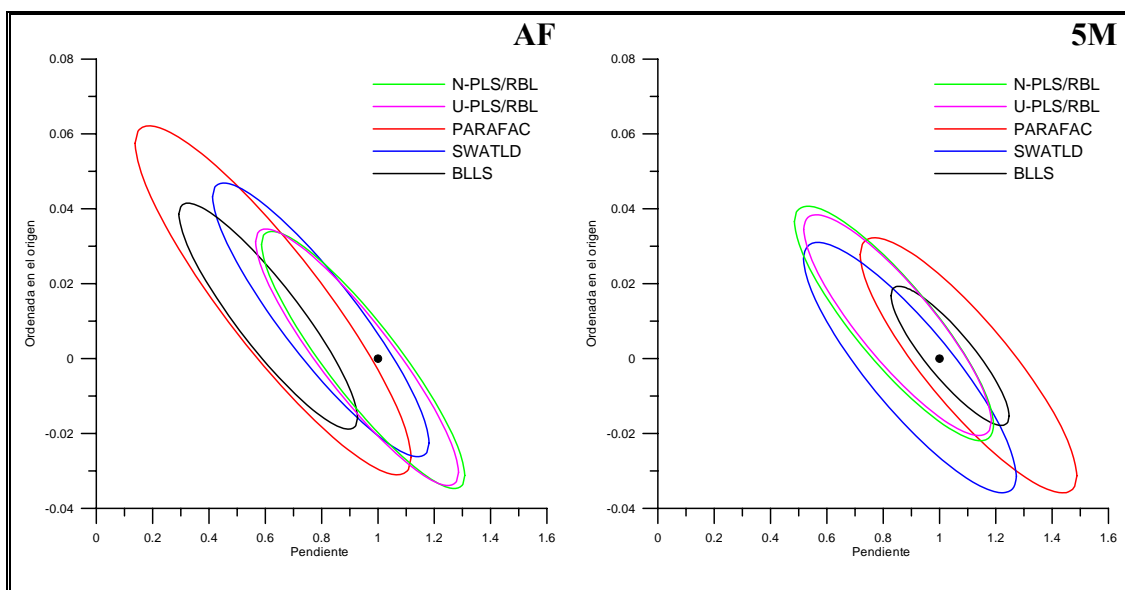


Figura V.35. EJCR (95 % de confianza) para la pendiente y la ordenada en el origen de las regresiones de la concentración teórica frente a la predicha de AF y 5M empleando N-PLS/RBL (—), U-PLS/RBL (—), PARAFAC (—), SWATLD (—) y BLLS (—) en muestras de suero.

Podemos decir que el tratamiento llevado a cabo con el suero es satisfactorio en el caso del 5M, obteniendo para todos los algoritmos una precisión comparable con la obtenida en muestras sintéticas. Sin embargo, para el AF obtenemos unas elipses de mayor tamaño. En este caso, las pendientes calculadas son inferiores a 1 (0.95, 0.93, 0.63, 0.80 y 0.61 para N-PLS/RBL, U-PLS/RBL, PARAFAC, SWATLD y BLLS, respectivamente), lo que puede deberse a peores rendimientos de recuperación del AF en el proceso de desproteneización y extracción del suero. Finalmente, las concentraciones predichas por PARAFAC y BLLS difieren de las teóricas para un nivel

de confianza del 95 % en el caso del AF, mientras que para el 5M se podrían aplicar los cinco algoritmos, presentando mayor precisión BLLS.

A la vista de los resultados anteriores, podemos decir que N-PLS/RBL, U-PLS/RBL y SWATLD son los algoritmos que mejores resultados proporcionan para ambos componentes, en la resolución de esta mezcla en muestras de suero, ya que, PARAFAC y BLLS, no predicen adecuadamente las concentraciones de AF. Asimismo, podemos concluir, que los menores valores de errores de predicción relativos (REP) se obtienen al aplicar los métodos N-PLS y U-PLS, en combinación con RBL.

#### **V.4. RESOLUCIÓN DE LA MEZCLA TERNARIA DE AF, 5M Y THF CON MÉTODOS DE CALIBRACIÓN MULTIVARIANTE DE SEGUNDO Y TERCER ORDEN**

A continuación se aborda la resolución de la mezcla ternaria constituida por ácido fólico (AF) y sus dos principales metabolitos, el ácido tetrahidrofólico (THF) y el ácido 5-metil tetrahidrofólico (5M). Para ello, utilizamos el montaje optimizado descrito en el apartado V.3 y seguimos la evolución de los espectros de emisión de fluorescencia con el tiempo de irradiación. De nuevo, emplearemos el programa MVC2 y los métodos de calibración multivariante de segundo orden N-PLS, U-PLS, PARAFAC, SWATLD y BLLS.

Las matrices de emisión-tiempo de irradiación se adquirieron registrando un total de 20 espectros de emisión entre 330 y 540 nm, excitando a 275 nm, a incrementos de tiempo de irradiación de 1 min. En la Figura V.36, se muestran estas matrices para cada uno de los analitos.

La evolución de la intensidad de fluorescencia con el tiempo de irradiación, de AF y 5M, ya la comentamos en el estudio anterior. En cuanto al comportamiento de THF con la irradiación, ya vimos, al inicio de este capítulo, que cuando se irradiaba, originaba un fotoproducto que presentaba un máximo de fluorescencia a 445 nm y, se mantiene, sin apenas variación, el máximo que inicialmente presenta a 350 nm. Los espectros de fluorescencia de este fotoproducto son muy similares a los que se originan a partir del AF, por lo que los perfiles de emisión de ambos compuestos tienden a igualarse a medida que se irradian las muestras, tal como puede apreciarse en la Figura V.35. Sin embargo, encontramos alguna diferencia en sus perfiles cinéticos.

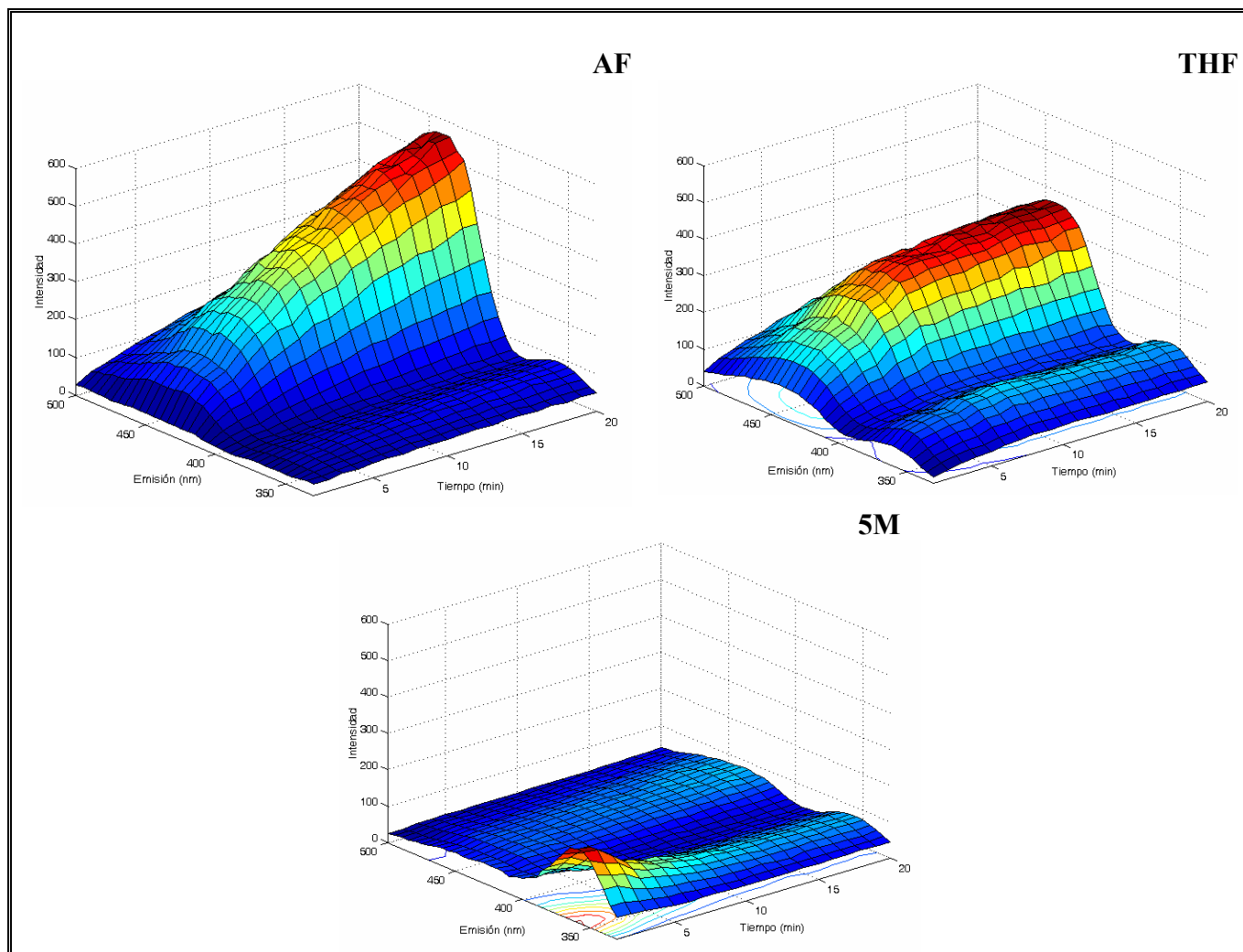


Figura V.36. Matrices de emisión-tiempo de irradiación de disoluciones de  $0.2 \mu\text{g mL}^{-1}$  de cada analito.

Si comparamos los perfiles cinéticos, encontramos diferencias significativas tal como se observa en la Figura V.37 y, estas diferencias, serán las que utilizaremos para abordar el estudio de la determinación simultánea de estos analitos.

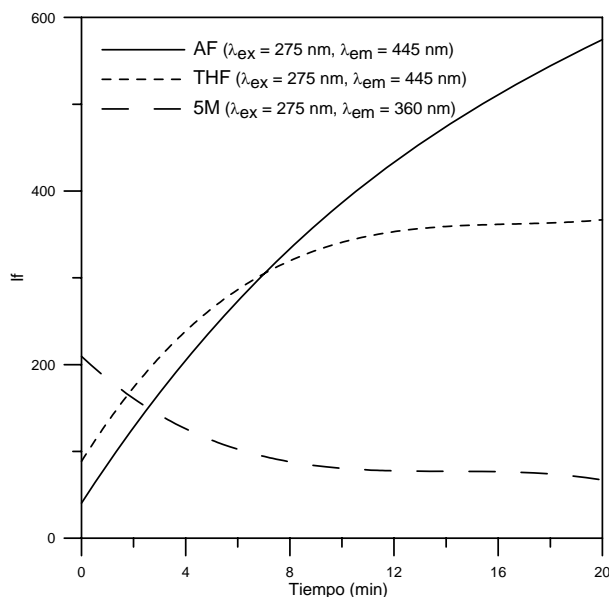


Figura V.37. Curvas cinéticas de  $0.2 \mu\text{g mL}^{-1}$  de cada analito.

Antes de abordar la resolución de esta mezcla ternaria, igual que en el estudio anterior, comprobamos la aditividad de las señales, ya que es necesario que se cumpla la condición de trilinealidad de los datos para que los algoritmos de segundo orden, PARAFAC, SWATLD y BLLS, nos proporcionen resultados satisfactorios. La trilinealidad no será una condición necesaria para aplicar los algoritmos N-PLS y U-PLS, más flexibles que los anteriores [53].

Para estudiar la aditividad de las señales, se registraron los espectros de emisión con el tiempo de irradiación, bajo las condiciones optimizadas, y se midieron las intensidades de los máximos de emisión (360 nm para el 5M y 445 nm para el AF y THF) a distintos tiempos de irradiación, para una mezcla de los tres componentes y para cada uno de ellos, individualmente. Encontramos que las señales no eran aditivas, especialmente para tiempos iniciales de irradiación, siendo mayor la suma de las intensidades de los componentes individuales que la de la mezcla. Para poder explicar este comportamiento, estudiamos la aditividad de las señales de los componentes de dos en dos, llegando a las siguientes conclusiones:

- En el caso de la mezcla de AF y 5M, como dijimos en el apartado anterior, las señales sí son aditivas en todos los tiempos. Esto se debe a que el posible filtro interno que podría darse (el 5M tiene un máximo de emisión cercano al máximo de excitación del AF), no es apreciable, ya que a tiempos iniciales de reacción la señal del AF es prácticamente inexistente, mientras que a tiempos finales lo es la del 5M.
- En el caso de la mezcla de THF y 5M, la intensidad de fluorescencia de la mezcla es menor que la suma matemática de las intensidades de fluorescencia de los componentes individuales, atenuándose esta diferencia para tiempos finales de reacción. Esto puede deberse a que el 5M presenta un máximo de emisión a 360 nm, longitud de onda cercana a la que el fotoproducto del THF presenta un máximo de excitación. Este posible efecto de filtro interno es menos apreciable a tiempos finales, debido a la desaparición del 5M.
- En el caso de la mezcla de AF y THF tampoco se cumple la aditividad siendo, la intensidad de fluorescencia de la mezcla, menor que la suma de las intensidades de fluorescencia de los componentes individuales. Esto puede deberse a que, al inicio de la fotorreacción, el THF presenta un máximo de emisión a 360 nm, cercano al máximo de excitación del AF.

Este estudio de aditividad se completó con el registro de los espectros de absorción de disoluciones individuales, que contenían  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  de cada analito, y de una disolución que contenía los tres analitos. Estos espectros de absorción se registraron con las muestras recién preparadas, y después de irradiarlas durante 20 minutos. Los espectros obtenidos se presentan en la Figura V.38.

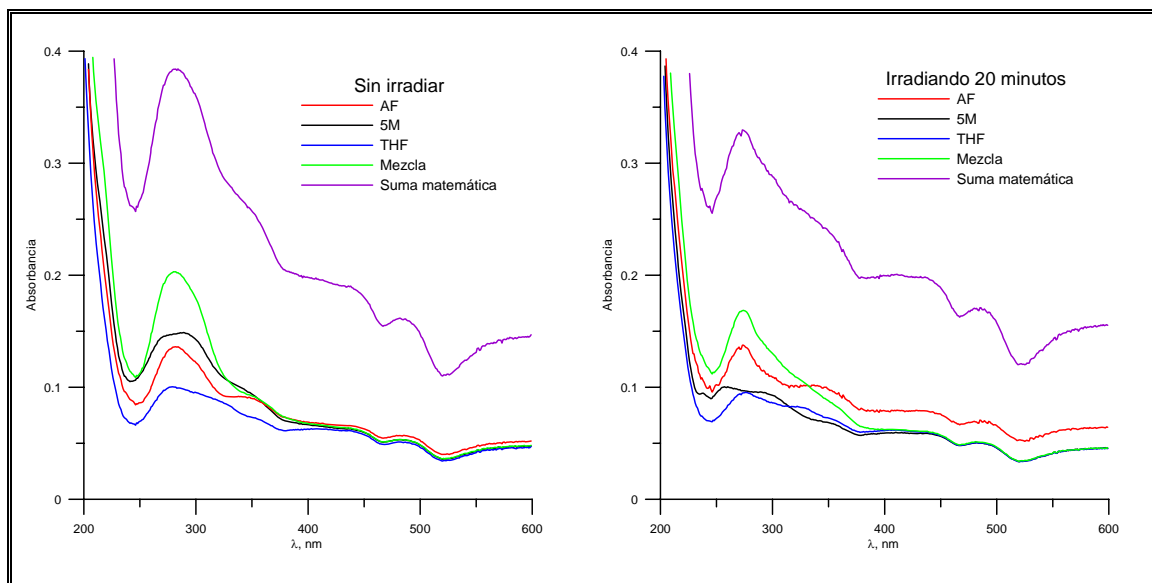


Figura V.38. Espectros de absorción de disoluciones de AF, 5M, THF y de una mezcla sin irradiar e irradiadas durante 20 minutos.

Del estudio de estos espectros podemos concluir que se produce un efecto de filtro interno en esta mezcla, lo que nos permite entender el motivo de la falta de aditividad de las señales, sobre todo a tiempos iniciales de reacción. Este efecto de filtro interno causará desviaciones en la trilinealidad de los datos y tendremos que tenerlo en cuenta a la hora de aplicar los distintos métodos de calibración multivariante.

#### V.4.1. Resolución de la mezcla de AF, 5M y THF empleando datos de segundo orden

En principio, se intenta resolver esta mezcla ternaria utilizando datos de segundo orden. Para ello, se registraron los espectros de emisión (longitud de onda de excitación de 275 nm) en el intervalo de 330 a 530 nm, tomando un punto cada 5 nm ( $J = 41$ ), durante 20 minutos, uno cada minuto ( $K = 20$ ), con lo que se obtenían 820 puntos experimentales.

Para la construcción de la matriz de calibración se empleó un diseño central compuesto con tres muestras centrales, con lo que el número total de muestras necesarias fue de 17 (P1-P17). Además, se incluyeron en la calibración tres blancos, por lo que el número final de muestras para realizar la calibración fue de 20. El intervalo de concentraciones empleadas para cada analito fue el comprendido entre 0 y 150 ng mL<sup>-1</sup>. Los valores de concentración empleados se muestran en la Tabla V.17.

*Tabla V.17. Composición de la matriz de calibración.*

<b>PATRONES</b>	<b>[AF], ng mL<sup>-1</sup></b>	<b>[5M], ng mL<sup>-1</sup></b>	<b>[THF], ng mL<sup>-1</sup></b>
P1	32	32	32
P2	32	32	118
P3	32	118	32
P4	32	118	118
P5	118	32	32
P6	118	32	118
P7	118	118	32
P8	118	118	118
P9	0	75	75
P10	150	75	75
P11	75	0	75
P12	75	150	75
P13	75	75	0
P14	75	75	150
P15	75	75	75
P16	75	75	75
P17	75	75	75
P18	0	0	0
P19	0	0	0
P20	0	0	0

También se prepararon un total de diez muestras formadas por mezclas ternarias, binarias e individuales (T1-T10). Este grupo de muestras (Tabla V.18) será utilizado para validar el modelo.



Tabla V.18. Composición del conjunto de validación.

MUESTRA	[AF], ng mL <sup>-1</sup>	[5M], ng mL <sup>-1</sup>	[THF], ng mL <sup>-1</sup>
T1	126	138	99
T2	147	83	59
T3	104	64	111
T4	72	92	126
T5	96	145	97
T6	35	119	133
T7	132	0	96
T8	0	42	123
T9	109	73	146
T10	0	100	0

La calibración multivariante de los datos de tres vías obtenidos se lleva a cabo utilizando los algoritmos N-PLS, U-PLS, PARAFAC, SWATLD y BLLS.

➤ **Calibración multivariante empleando N-PLS y U-PLS**

En primer lugar, optimizamos tanto el intervalo de longitudes de onda de emisión como el de tiempo de irradiación más adecuado para realizar este estudio, analizando el coeficiente de determinación,  $R^2$ , y el PRESS para los distintos intervalos ensayados. En la Tabla V.19 se muestran los resultados obtenidos para ambos parámetros, así como los intervalos óptimos seleccionados que se emplearán en los sucesivos estudios. Después de realizar la validación cruzada y, de acuerdo con el criterio de Haaland y Thomas [51], obtuvimos un número óptimo de factores igual a 3.

Tabla V.19. Intervalos óptimos y parámetros estadísticos de los modelos N-PLS y U-PLS para cada analito.

$A^* = 3$	Intervalo**	N-PLS		U-PLS	
		PRESS	$R^2$	PRESS	$R^2$
<b>AF</b>	420-490 nm 1-15 min	$1.96 \times 10^3$	0.997	$2.14 \times 10^3$	0.997
<b>5M</b>	330-390 nm 1-17 min	$8.51 \times 10^3$	0.984	$8.97 \times 10^3$	0.983
<b>THF</b>	330-530 nm 1-20 min	$3.77 \times 10^4$	0.988	$3.39 \times 10^4$	0.979

\*A = n° de factores.

\*\* $\Delta\lambda = 5$  nm,  $\Delta t = 1$  min.

Los métodos de calibración anteriores, ya optimizados, han sido aplicados a la determinación de estos analitos en las muestras del conjunto de validación, cuya composición se muestra en la Tabla V.18. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla V.20, donde observamos una elevada dispersión en los valores de recuperación obtenidos. Además, los errores relativos de predicción son muy elevados en todos los casos, teniendo en cuenta que las determinaciones se han realizado en muestras acuosas, por lo que podemos concluir que los métodos de calibración multivariante de segundo orden, N-PLS y U-PLS, no resuelven adecuadamente la mezcla ternaria propuesta, por lo que, en estudio posteriores, abordaremos su resolución empleando datos de tercer orden.

Tabla V.20. Resultados obtenidos al aplicar los modelos N-PLS y U-PLS en la determinación de AF, 5M y THF en muestras sintéticas.

	AF		5M		THF	
	N-PLS	U-PLS	N-PLS	U-PLS	N-PLS	U-PLS
% Rec <sup>a</sup> . $\pm$ SD	$109 \pm 31$	$108 \pm 12$	$114 \pm 39$	$115 \pm 40$	$96 \pm 26$	$86 \pm 43$
REP, %	14.1	13.5	28.6	29.3	23.4	29.3
RMSEP	11.5	11.1	24.5	25.1	23.2	29.0

<sup>a</sup>Valor de recuperación medio para las 10 muestras del conjunto de validación.

➤ ***Calibración multivariante empleando PARAFAC, SWATLD y BLLS***

También se aplicaron los algoritmos PARAFAC, SWATLD y BLLS para la resolución de esta mezcla ternaria en las muestras del conjunto de validación. En los tres casos, los perfiles proporcionados para cada componente no se corresponden con los analitos puros, sino con combinaciones entre ellos y las predicciones obtenidas no fueron satisfactorias en ninguno de los casos. Esto se puede explicar teniendo en cuenta que, al tener un efecto de filtro interno, los datos se alejan de la trilinealidad y estos algoritmos, en principio, pierden capacidad para modelarlos y habilidad predictiva [53], en comparación con otros más flexibles como N-PLS y U-PLS.

***V.4.2. Resolución de la mezcla de AF, 5M y THF empleando datos de tercer orden***

Como hemos comprobado en el apartado V.4.1, aplicando métodos de calibración multivariante de segundo orden no se obtienen resultados adecuados para la mezcla ternaria de AF, 5M y THF. En el caso de PARAFAC, SWATLD y BLLS probablemente debido al efecto de filtro interno y, en el caso de N-PLS y U-PLS, debido a la similitud de los perfiles de AF y THF. Debido a este hecho, decidimos utilizar datos de cuatro vías, con los que, teóricamente, debe mejorarse la capacidad predictiva de estos métodos de calibración, al disponer de un canal adicional de información. Para ello, registraremos la evolución de las matrices de excitación-emisión de fluorescencia (EEMs) con el tiempo de irradiación y, para analizar estos datos, empleamos el programa MVC3 (Multivariate Calibration for Third-Order).

Las matrices de excitación-emisión se registraron en el intervalo de 330 a 505 nm (tomando un punto cada 7 nm), en emisión y de 250 a 378 nm, en excitación (tomando un punto cada 8 nm). En total se registraron 10 EEMs, una cada 2 minutos. En la Figura V.39 se muestran los mapas de contorno de las EEMs de cada analito, antes y después de la irradiación. Se tuvo especial cuidado a la hora de optimizar los

intervalos de longitudes de onda de cada analito, evitando incluir las dispersiones Rayleigh en el análisis de los datos.

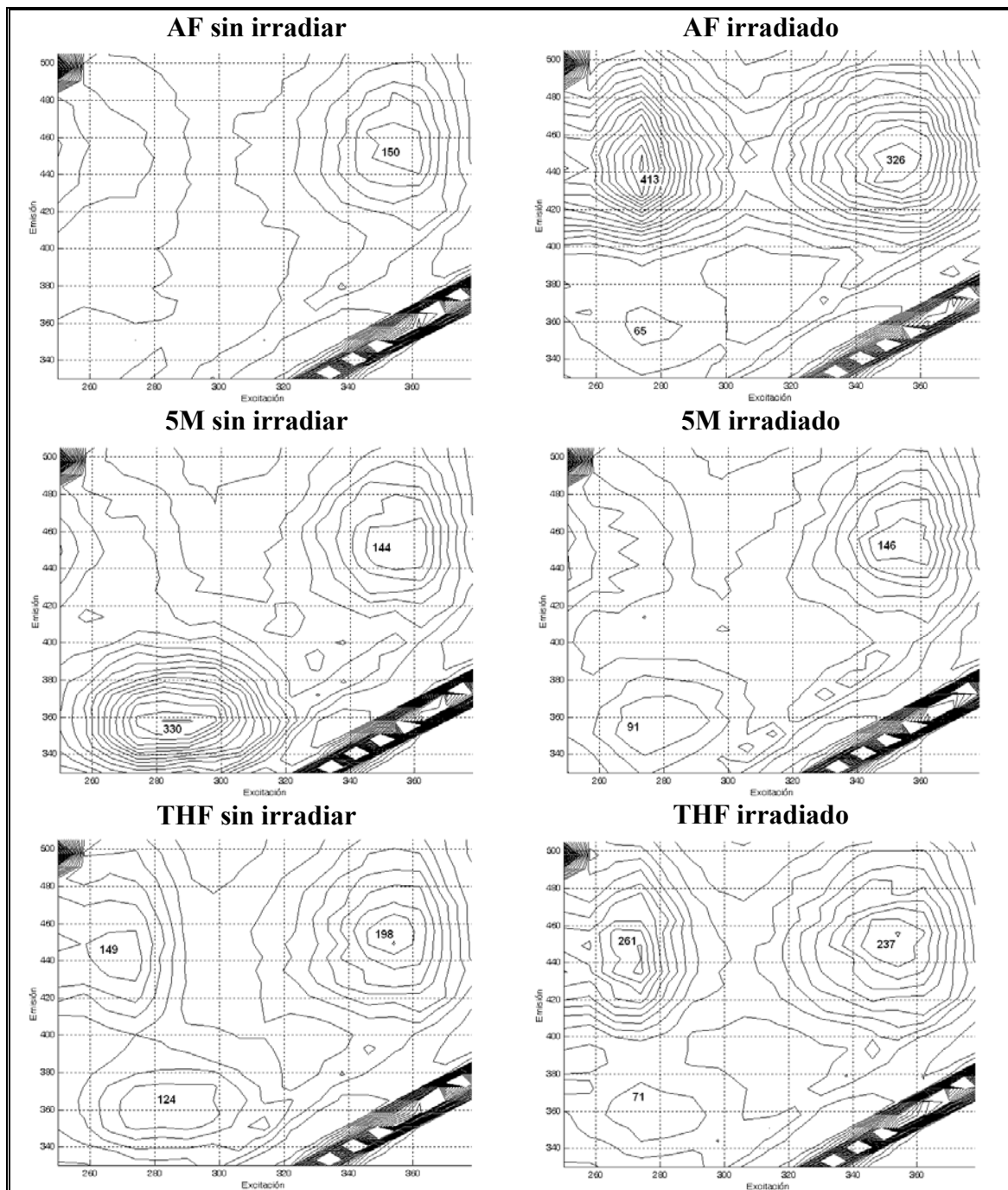


Figura V.39. Mapas de contorno de las EEMs antes y después de irradiar 20 minutos.  $[AF] = 0.15 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $[5M] = 0.3 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $[THF] = 0.15 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

De nuevo estudiamos la aditividad de las señales, para ello registramos las EEMs de una mezcla ternaria de AF, 5M y THF y de cada uno de ellos por separado, y comparamos las intensidad de fluorescencia de los máximos a distintos tiempos. En todos los casos, observamos que la fluorescencia de la mezcla de los 3 componentes era inferior a la suma de la fluorescencia de los componentes por separado, lo que ponía de manifiesto el efecto de filtro interno que presentaba la mezcla.

Para la construcción de la matriz de calibración se siguió el diseño central compuesto con tres muestras centrales, ya comentado anteriormente, al que se añadieron 3 blancos y otras 3 muestras, compuestas por 75 ng mL<sup>-1</sup> de AF, 5M o THF, obteniendo en total un conjunto de calibración formado por 23 patrones, Tabla V.21. También se empleó, de nuevo, un conjunto de muestras formadas por mezclas ternarias, binarias e individuales, para validar el modelo, Tabla V.18.

Tabla V.21. Composición de la matriz de calibración.

PATRONES	[AF], ng mL <sup>-1</sup>	[5M], ng mL <sup>-1</sup>	[THF], ng mL <sup>-1</sup>
P1	32	32	32
P2	32	32	118
P3	32	118	32
P4	32	118	118
P5	118	32	32
P6	118	32	118
P7	118	118	32
P8	118	118	118
P9	0	75	75
P10	150	75	75
P11	75	0	75
P12	75	150	75
P13	75	75	0
P14	75	75	150
P15	75	75	75
P16	75	75	75
P17	75	75	75
P18	0	0	0
P19	0	0	0
P20	0	0	0
P21	75	0	0
P22	0	75	0
P23	0	0	75

Se aplicaron los métodos de calibración multivariante de tercer orden PARAFAC, SWATLD, TLLS, N-PLS y U-PLS y, del análisis del conjunto de calibración y las muestras de validación, llegamos a las siguientes conclusiones:

- De nuevo comprobamos que PARAFAC, SWATLD y TLLS (extensión de BLLS para datos de cuatro vías) no modelan adecuadamente los datos, que no cumplen la condición de cuatrilínealidad.
- Los algoritmos N-PLS y U-PLS nos proporcionaron excelentes resultados en las predicciones de AF, que es el más sensible de los analitos, mientras que para el THF y 5M los resultados encontrados no fueron satisfactorios, teniendo en cuenta que las muestras estudiadas estaban preparadas en agua. Debido a ello, se decidió modificar el diseño empleado, con objeto de aumentar la selectividad. Para ello, se acortaron los intervalos de emisión, excitación y tiempo, aumentando el número de puntos en los nuevos intervalos, para así tener mayor información en las zonas más críticas.

Observando la Figura V.37, decidimos acortar el tiempo de irradiación a 12 minutos, y registrar una EEM cada minuto, para tener mayor información cinética. Así, aumentará la selectividad entre AF y THF y obtendremos más información de 5M, cuya cinética de descomposición finaliza en apenas ocho minutos. Para evitar registrar la dispersión Rayleigh (Figura V.39), que no nos proporciona información útil de los analitos, acortamos el intervalo de excitación y registramos las EEMs desde 250 hasta 316 nm (cada 6 nm), que es la zona de mayor diferenciación espectral entre 5M y THF, antes y después de la irradiación. Respecto a la emisión, registramos desde 330 hasta 504 nm (cada 6 nm). En total tendremos 4680 puntos espectrales (13x12x30).

Con estas nuevas condiciones instrumentales, se registran de nuevo las 23 muestras de la matriz de calibración y las muestras del conjunto de validación, Tabla V.22, y aplicamos los métodos de calibración multivariante de tercer orden N-PLS y U-PLS.

Tabla V.22. Composición del conjunto de validación.

MUESTRA	[AF], ng mL <sup>-1</sup>	[5M], ng mL <sup>-1</sup>	[THF], ng mL <sup>-1</sup>
T1	100	0	0
T2	95	60	78
T3	110	35	100
T4	75	100	90
T5	85	40	75
T6	0	70	60
T7	100	60	100
T8	150	50	150
T9	150	150	150
T10	100	40	100

Al aplicar los algoritmos N-PLS y U-PLS, encontramos los mejores valores de  $R^2$  y PRESS al emplear los intervalos completos tanto de longitudes de onda como de tiempo de las EEMs y, en todos los casos, se encontró un número óptimo de factores igual a 3. Estos resultados se recogen en la Tabla V.23.

 Tabla V.23. Valores de PRESS,  $R^2$  de los modelos N-PLS y U-PLS para cada componente.

<b>A = 3</b>	<b>N-PLS</b>		<b>U-PLS</b>	
	PRESS	$R^2$	PRESS	$R^2$
<b>AF</b>	$1.08 \times 10^4$	0.988	$1.31 \times 10^4$	0.988
<b>5M</b>	$6.74 \times 10^3$	0.971	$6.59 \times 10^3$	0.971
<b>THF</b>	$2.14 \times 10^4$	0.980	$1.65 \times 10^4$	0.979

Los resultados obtenidos en el análisis del conjunto de validación, aplicando N-PLS y U-PLS, se muestran en la Tabla V.24 y Tabla V.26. Podemos comprobar la disminución de los errores relativos de predicción para los tres analitos con ambos algoritmos, respecto a los resultados obtenidos al emplear datos de segundo orden, Tabla V.20. Por lo tanto, consideramos satisfactorios los resultados obtenidos, teniendo en cuenta la complejidad de la mezcla en estudio.

Tabla V.24. Aplicación del modelo N-PLS a la determinación de AF, 5M y THF en muestras sintéticas.

TEST	AF			THF			5M		
	Puesto ng mL <sup>-1</sup>	Predicho ng mL <sup>-1</sup>	Rec %	Puesto ng mL <sup>-1</sup>	Predicho ng mL <sup>-1</sup>	Rec %	Puesto ng mL <sup>-1</sup>	Predicho ng mL <sup>-1</sup>	Rec %
<b>1</b>	100	89	<b>89</b>	0	1.4	-	0	2.30	-
<b>2</b>	95	84	<b>89</b>	78	78	<b>100</b>	60	54	<b>90</b>
<b>3</b>	110	106	<b>96</b>	100	88	<b>88</b>	35	39	<b>111</b>
<b>4</b>	75	77	<b>103</b>	90	94	<b>104</b>	100	91	<b>91</b>
<b>5</b>	85	86	<b>101</b>	75	73	<b>97</b>	40	37	<b>92</b>
<b>6</b>	0	2.4	-	60	65	<b>108</b>	70	69	<b>98</b>
<b>7</b>	100	86	<b>86</b>	100	114	<b>114</b>	60	60	<b>100</b>
<b>8</b>	150	146	<b>97</b>	150	157	<b>105</b>	50	58	<b>117</b>
<b>9</b>	150	122	<b>81</b>	150	152	<b>101</b>	150	118	<b>79</b>
<b>10</b>	100	91	<b>91</b>	100	81	<b>81</b>	40	39	<b>98</b>
	Rec <sup>a</sup> ± SD		<b>92 ± 7</b>	Rec <sup>a</sup> ± SD		<b>100 ± 10</b>	Rec <sup>a</sup> ± SD		<b>97 ± 11</b>
	RMSEP		<b>11.6</b>	RMSEP <sup>a</sup>		<b>8.9</b>	RMSEP		<b>11.1</b>
	REP, %		<b>12.0</b>	REP <sup>b</sup> , %		<b>9.9</b>	REP, %		<b>18.4</b>

<sup>a</sup>Rec: Valor medio de las recuperaciones.



Tabla V. 25. Aplicación del modelo U-PLS a la determinación de AF, 5M y THF en muestras sintéticas.

TEST	AF			THF			5M		
	Puesto ng mL <sup>-1</sup>	Predicho ng mL <sup>-1</sup>	Rec %	Puesto ng mL <sup>-1</sup>	Predicho ng mL <sup>-1</sup>	Rec %	Puesto ng mL <sup>-1</sup>	Predicho ng mL <sup>-1</sup>	Rec %
<b>1</b>	100	87	<b>87</b>	0	4.5	-	0	6	-
<b>2</b>	95	94	<b>99</b>	78	83	<b>106</b>	60	53	<b>88</b>
<b>3</b>	110	113	<b>103</b>	100	89	<b>89</b>	35	46	<b>131</b>
<b>4</b>	75	80	<b>107</b>	90	92	<b>102</b>	100	92	<b>92</b>
<b>5</b>	85	85	<b>100</b>	75	77	<b>103</b>	40	40	<b>100</b>
<b>6</b>	0	5	-	60	58	<b>97</b>	70	69	<b>99</b>
<b>7</b>	100	97	<b>97</b>	100	106	<b>106</b>	60	68	<b>113</b>
<b>8</b>	150	154	<b>103</b>	150	166	<b>111</b>	50	54	<b>108</b>
<b>9</b>	150	128	<b>85</b>	150	160	<b>107</b>	150	125	<b>83</b>
<b>10</b>	100	98	<b>98</b>	100	70	<b>70</b>	40	41	<b>103</b>
	Rec <sup>a</sup> ± SD		<b>98 ± 7</b>	Rec <sup>a</sup> ± SD		<b>99 ± 13</b>	Rec <sup>a</sup> ± SD		<b>102 ± 14</b>
	RMSEP		<b>8.6</b>	RMSEP		<b>12.1</b>	RMSEP		<b>9.8</b>
	REP, %		<b>8.9</b>	REP, %		<b>13.4</b>	REP, %		<b>16.3</b>

<sup>a</sup>Rec: Valor medio de las recuperaciones.

Se aplicó el test de la elipse, EJCR, para comparar los valores de concentración teóricos con los predichos por cada método, Figura V.40. En todos los casos, el punto teórico (1,0) está dentro de las elipses, lo que indica que no difiere de los valores de pendiente y ordenada en el origen calculados o, lo que es lo mismo, que no hay diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones teóricas y las predichas, para un nivel de confianza del 95 %. Además, del tamaño de las elipses, podemos concluir que N-PLS nos proporciona resultados más precisos, especialmente en el caso del THF.

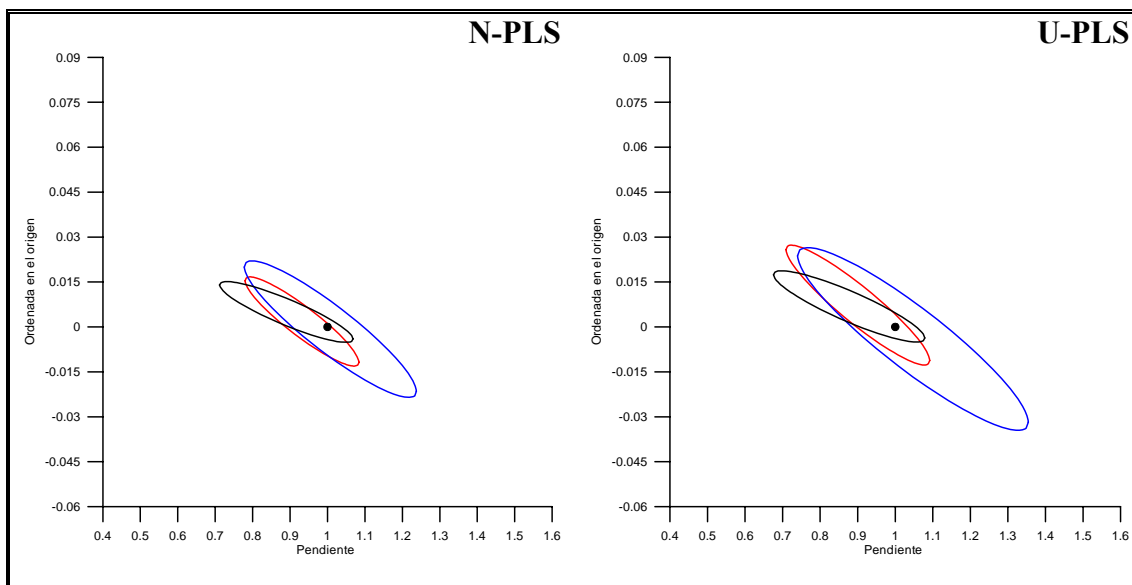


Figura V.40. EJCR (95 % de confianza) para la pendiente y la ordenada en el origen de las regresiones de la concentración teórica frente a la predicha de AF (—), THF (—) y 5M (—) empleando N-PLS y U-PLS en muestras sintéticas.

#### V.4.3. Determinación de AF, THF y 5M en muestras de suero

Una vez comprobado que los métodos propuestos, N-PLS y U-PLS, son apropiados para resolver problemas sintéticos en disolución acuosa, vamos a aplicar estos métodos a la determinación de AF y sus metabolitos 5M y THF, en muestras de suero.

Para llevar a cabo esta aplicación, se registraron las EEMs de las muestras de suero previamente contaminadas y se calcularon las recuperaciones de cada analito, empleando los métodos de calibración multivariante N-PLS y U-PLS, combinados con un procedimiento denominado *trilinealización residual*, RTL, que les proporciona la ventaja de segundo orden, como explicamos anteriormente.

Basándonos en ensayos realizados previamente, se probó a precipitar las proteínas del suero con ácido tricloroacético y ácido perclórico, seguido de un paso de neutralización. Además, se ensayó esta etapa con metanol. Se optó por esta última

opción por su simplicidad y porque obteníamos un suero más limpio. El procedimiento seguido fue el siguiente:

1. En un tubo de centrifugación añadimos:
  - AF, THF y 5M, siendo el volumen total 0.1 mL.
  - 0.1 mL de suero.
  - 1 mL de metanol.
2. Se centrifuga la muestra durante 5 minutos.
3. Tomamos 0.5 mL del sobrenadante, que llevamos a un matraz de 10 mL, añadimos 0.8 mL de disolución reguladora HAc/NaAc 0.5 M y diluimos con agua hasta enrase.

Finalmente, las muestras contenían un 4.2 % de metanol, por lo que antes de proceder a la resolución mediante calibración multivariante, se registraron los espectros de fluorescencia de los analitos bajo estas nuevas condiciones, no encontrando diferencias, por lo que no fue necesario hacer la matriz de calibración en presencia de metanol.

Siguiendo este procedimiento, la dilución total del suero es de 240 veces, lo que implica que, con el rango de calibración realizado, se determinará AF, THF y 5M hasta una concentración de  $36 \text{ mg L}^{-1}$ .

Además de los 3 factores necesarios para realizar el análisis en muestras acuosas, se necesitó considerar un componente más, como interferente, al emplear el procedimiento RTL, cuando se analizaron las muestras de suero. En la Figura V.41 se muestra la variación de los residuos de predicción ( $sr$ ) en función del número de interferentes ( $N_{int}$ ).

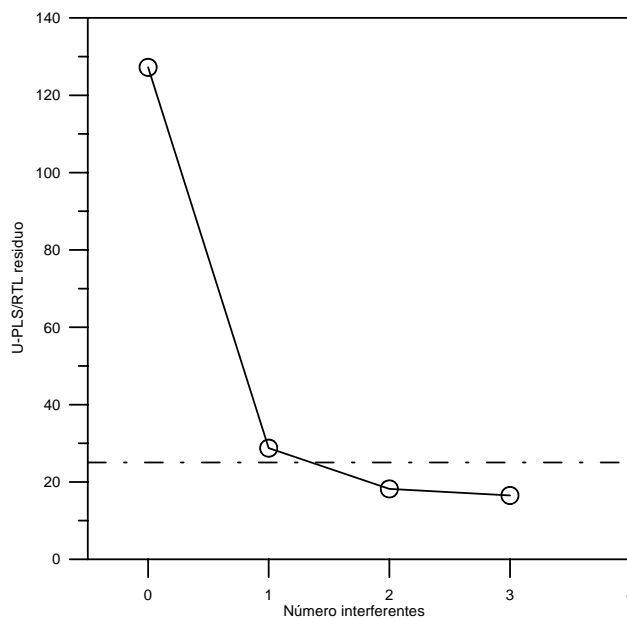


Figura V.41. Representación de los residuos de predicción ( $sr$ ) en función del número de interferentes ( $N_i$ ) para la muestra de suero 4, que contiene  $117 \text{ ng mL}^{-1}$  de AF,  $169 \text{ ng mL}^{-1}$  de THF y  $87 \text{ ng mL}^{-1}$  de 5M. El nivel de ruido en este sistema es de 25 unidades relativas de fluorescencia (- - - - -).

Los resultados obtenidos al aplicar los modelos N-PLS/RTL y U-PLS/RTL a las muestras de suero se muestran en la Tabla V.26 y la Tabla V.27 y, en la Figura V.42, se representan las elipses obtenidas al comparar las concentraciones teóricas frente a las encontradas, por cada método, en las muestras de suero.

Tabla V.26. Aplicación del modelo N-PLS/RTL a la determinación de AF, 5M y THF en muestras de suero.

TEST	AF			THF			5M		
	Puesto ng mL <sup>-1</sup>	Predicho ng mL <sup>-1</sup>	Rec %	Puesto ng mL <sup>-1</sup>	Predicho ng mL <sup>-1</sup>	Rec %	Puesto ng mL <sup>-1</sup>	Predicho ng mL <sup>-1</sup>	Rec %
1	0	-	-	0	-	-	91	101	101
2	32	24	75	168	189	113	28	33	118
3	36	29	81	34	30	88	0	-	-
4	117	108	92	169	167	99	87	80	92
5	77	71	92	168	187	111	76	72	95
6	0	-	-	0	-	-	82	93	113
7	72	62	86	0	-	-	138	129	93
8	71	74	104	167	174	104	0	-	-
9	93	100	108	92	115	125	47	55	117
10	52	45	87	162	140	86	150	121	81
11	16	26	163	156	165	106	61	66	108
12	52	58	112	213	233	109	58	45	78
	Rec ± SD		<b>100 ± 25</b>	Rec ± SD		<b>105 ± 12</b>	Rec ± SD		<b>100 ± 14</b>
	RMSEP		<b>7.6</b>	RMSEP		<b>16.2</b>	RMSEP		<b>12.1</b>
	REP, %		<b>12.2</b>	REP, %		<b>11.0</b>	REP, %		<b>14.9</b>

Tabla V.27. Aplicación del modelo U-PLS/RTL a la determinación de AF, 5M y THF en muestras de suero.

TEST	AF			THF			5M		
	Puesto ng mL <sup>-1</sup>	Predicho ng mL <sup>-1</sup>	Rec %	Puesto ng mL <sup>-1</sup>	Predicho ng mL <sup>-1</sup>	Rec %	Puesto ng mL <sup>-1</sup>	Predicho ng mL <sup>-1</sup>	Rec %
1	0	-	-	0	-	-	91	99	109
2	32	26	80	168	140	83	28	37	137
3	36	40	111	34	42	123	0	-	-
4	117	129	110	169	174	103	87	89	102
5	77	75	97	168	148	88	76	86	113
6	0	-	-	0	-	-	82	81	99
7	72	86	119	0	-	-	138	112	81
8	71	75	106	167	176	105	0	-	-
9	93	113	105	92	127	137	47	62	133
10	52	48	79	162	146	90	150	119	79
11	16	25	156	156	148	95	61	57	93
12	52	49	95	213	219	103	58	59	98
	Rec ± SD		<b>106 ± 22</b>	Rec ± SD		<b>103 ± 17</b>	Rec ± SD		<b>104 ± 19</b>
	RMSEP		<b>9.6</b>	RMSEP <sup>a</sup>		<b>18.0</b>	RMSEP		<b>14.6</b>
	REP, %		<b>15.5</b>	REP <sup>b</sup> , %		<b>12.2</b>	REP, %		<b>17.8</b>

Los valores medios de recuperación obtenidos para los tres analitos son similares, además, podemos considerar satisfactorios estos resultados, teniendo en cuenta la complejidad de las muestras analizadas.

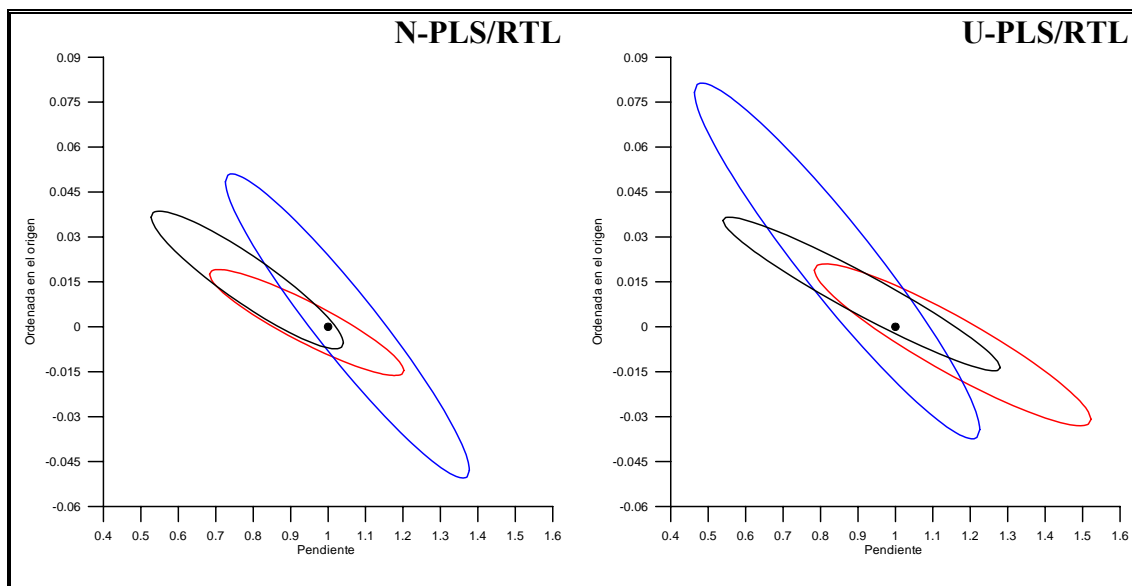


Figura V.42. EJCR (95 % de confianza) para la pendiente y la ordenada en el origen de las regresiones de la concentración teórica frente a la predicha de AF (—), THF (—) y 5M (—) empleando N-PLS/RTL y U-PLS/RTL en muestras de suero.

Como observamos en la figura anterior, el punto teórico (1,0) se encuentra dentro de las tres elipses, para ambos métodos, lo que indica que las concentraciones teóricas no difieren de las predichas para un nivel de confianza del 95 %, para los tres analitos, al aplicar N-PLS/RTL y U-PLS/RTL. Además, el tamaño de la elipse para el THF es mayor con ambos métodos, lo que indica que los resultados son menos precisos que en el caso del AF y 5M.

## V.5. CONCLUSIONES

El ácido fólico y su metabolito, ácido tetrahidrofólico, generan unos fotoproductos con irradiación UV que presenta una elevada fluorescencia. Sin embargo, cuando el metabolito ácido 5-metil tetrahidrofólico es irradiado se produce la fotólisis de la molécula de forma prácticamente total, desapareciendo su fluorescencia. De este modo, hemos empleado el diferente comportamiento de los analitos frente a la radiación UV, como parámetro discriminante, para determinarlos simultáneamente mediante un método cinético.

En primer lugar, se propone un método para la determinación simultánea de ácido fólico y su metabolito, ácido 5-metil tetrahidrofólico, empleando datos de segundo orden (la evolución cinética de los espectros de emisión de fluorescencia de los fotoproductos con el tiempo de irradiación). Para ello, se diseñó un sistema de irradiación en continuo, con objeto de automatizar la toma de datos, cuyos parámetros se optimizaron empleando el diseño de experimentos y la metodología de superficie de respuesta.

Todos los algoritmos de segundo orden empleados (N-PLS, U-PLS, PARAFAC, SWATLD y BLLS) mostraron resultados satisfactorios en la resolución de esta mezcla en muestras acuosas. Sin embargo, en muestras de suero, los algoritmos N-PLS y U-PLS acoplados a RBL fueron los que proporcionaron unos mejores resultados en las predicciones.

Asimismo, se propone un método para la determinación de la mezcla ternaria de ácido fólico y sus metabolitos, ácido 5-metil tetrahidrofólico y ácido tetrahidrofólico, empleando métodos de calibración multivariante de tercer orden, que muestran mayores habilidades predictivas que los de segundo orden, incapaces de resolver adecuadamente esta mezcla ternaria.

Los datos de cuatro vías que empleamos fueron la evolución de las matrices de excitación-emisión de fluorescencia (EEMs) con el tiempo de irradiación. En este

trabajo pudimos comprobar que PARAFAC, SWATLD y TLLS no modelan adecuadamente los datos que no cumplen la condición de cuatrilínealidad y tan solo empleando los métodos de calibración N-PLS y U-PLS, combinados con el procedimiento RTL, se logró resolver la mezcla ternaria en muestras de suero, ya que estos métodos nos proporcionan una mayor flexibilidad frente a comportamientos que se apartan de la linealidad, así como la ventaja de segundo orden.



## V.6. BIBLIOGRAFÍA

1. <http://www.consumaseguridad.com/web/es/investigacion/2003/06/03/6711.php>
2. Nelson B.C., Dalluge J.J., Margolis S.A., *J. Chrom B*, 765 (2001) 141.
3. Kim Y. I., *J. Nutr Biochem*, 10 (1999) 66.
4. <http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/a020.htm>
5. Fitzgerald J.M., Ed., *Analytical Photochemistry and Photochemical Analysis*, Marcel Dekker, New York, (1971) p. 145.
6. Lukasiewicz R.J., Fitzgerald J.M., *Anal. Chem.*, 45 (1973) 511.
7. Lukasiewicz R.J., Fitzgerald J.M., *Appl. Spectrosc.*, 28 (1974) 151.
8. Kikuta C., Schmid R., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 7 (1989) 329.
9. Harman P.J., Blackman G.L., Philipou G., *J. Chromatogr.*, 225 (1981) 131.
10. Thsuchiya M., Aaron J.J., Torres E., Winefordner J.D., *Anal. Lett.*, 18 (1985) 1647.
11. Kan R.O., *Organic Photochemistry*, McGraw-Hill, New York (1966) 219.
12. Brown R.R., Bam R., Craig Jordan V., *J. Chromatogr., Biomed. Appl.*, 272 (1983) 351.
13. Aaron J.J., Diop A., *Analyst*, 13 (1985) 40.
14. Shih Y.T., Carr P.W., *Anal. Chim. Acta*, 159 (1984) 211.
15. Miles C.J., Moye H.A., *Anal. Chem.*, 60 (1988) 220.
16. Werkhoven Goewie C.E., Boon W.M., Praat A.J.J., Frei R.W., Brinkman U.A., Little C.J., *Chromatographia*, 16 (1982) 53.
17. Aaron J.J., Villafranca J.E., White V.R., Fitzgerald J.M., *Appl. Spectrosc.*, 30 (1976) 59.
18. Lefevre M.F., Frel R.W., Scholten A.H.M.T., Brinkman U.A., *Chromatographia*, 15 (1982) 459.
19. Traore, S. y Aaron, J.J., *Anal. Lett.*, 1987, 20, 1995.
20. White V.R., Fring C.S., Villafranca J.E., Fitzgerald J.M., *Anal. Chem.*, 48 (1976) 314.
21. Laasis B., Aaron J.J., Mahedero M.C., *Anal. Chim. Acta*, 290 (1994) 27.
22. Gandelman M.S., Birks J.W., *J. Chromatogr.*, 242 (1982) 21.
23. Arakawa Y., Imai, K., Tamura Z., *Anal. Chim. Acta*, 147 (1983) 325.
24. Lukasiewicz R. J., Fitzgerald J.M., *Anal. Chem.*, 45 (1973) 511.

25. Pérez R., Rupérez A., Laserna J. J., Felidj N., Laassis B., Aaron J. J., Aubard J., *Anal. Chim. Acta*, 369 (1998) 197.
26. Sanchez Peña M., Salinas F., Mahedero M.C., Aaron J J, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 10 (1992) 805.
27. Mahedero M.C., Mora Díaz N., Muñoz de la Peña A., Espinosa Mansilla A., González Gómez D., Bohoyo Gil D., *Talanta*, 65 (2004) 806.
28. Bettaieb L., Aaron J J, *Turkish J. Chem.*, 25 (2001) 165.
29. Fricoteaux R., Quaglia M., Aaron J J, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 7 (1989) 1585.
30. Xiang Qun Guo, Yi Bing Zhao, Jin Gou Xu, *Anal. Chim. Acta*, 342 (1997) 109.
31. Yang W., Zhang T., Zhao H., Jin L., *Anal. Lett.*, 33 (2000) 3303.
32. Cai W. P., Ouyang Y. G., Lin X. Y., Yun J. G., *Anal. Lett.*, 31 (1998) 439.
33. Rodríguez Procopio J., Hernández Hernández P., Hernández Hernández L., *Analyst*, 112 (1987) 79.
34. Cai W. P., Ouyang Y. G., Chen J. M., Tang G. Q., *Fenxi Huaxue*, 25 (1997) 519.
35. Traore S., Aaron J. J., *Anal. Lett.*, 20 (1987) 1995.
36. Vilchez J. L., El-Khattabi R., Blanc R., Navalón A., *Anal. Chim. Acta*, 371 (1998) 247.
37. Fidanza J., Aaron J. J., *Talanta*, 29 (1982) 383.
38. Fidanza J., Aaron J. J., *Talanta*, 30 (1983) 649.
39. Fidanza J., Aaron J. J., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 5 (1987) 619.
40. Welling P. L. M., de Vries G., Scholten A. H. M. T., Frei R. W., *J. Chromatogr. A*, 217 (1981) 463.
41. Chen D., Ríos A., Luque de Castro M. D., Valcárcel M., *Analyst*, 116 (1991) 171.
42. Chen D., Ríos A., Luque de Castro M. D., Valcárcel M., *Talanta*, 38 (1991) 1227.
43. Lapa R. A. S., Lima J. L. F. C., Reis B. F., Santos J. L. M., Zagatto E. A. G., *Anal. Chim. Acta*, 351 (1997) 223.
44. Wittle E.L., O'Dell J.M., Vanderbelt J.M., Pfiffner J.J., *J Am Chem Soc*, 69 (1947) 1786.
45. Muñoz de la Peña A., Durán Merás I., Jiménez Girón A., *Anal. Bioanal. Chem*, 76 (2004) 5657.

46. Myers R. H., Montgomery D. C.; “*Response Surface Methodology: process and product optimization using designed experiment*”, Wiley-interscience, Nueva York, (2002).
47. Schoofs A.J.G., “*Experimental design and structural optimization*”. Tesis Doctoral, University of Technology, Eindhoven, (1987).
48. Cuadros Rodríguez L., García Campaña Ana M., Jiménez Linares C., Román Ceba M., *Anal. Lett.*, 26 (1993) 1243.
49. Andrew Clayton C., Hines J. W., Elkins Phillis D., *Anal. Chem.*, 59 (1987) 2506.
50. Long G. L., Wineford J. D., *Anal. Chem.*, 55 (1983) 712.
51. Haaland D.M., Thomas E.V., *Anal. Chem.*, 60 (1988) 1202.
52. Schleyer E., Reinhardt J., Unterhalt M., Hiddemann W., *J. Chrom. B*, 669 (1995) 319.
53. Escandar G. M., Faber N. M., Goicochea H. C., Muñoz de la Peña A., Olivieri A.C., Poppi R.J., *Trends in Anal. Chem.*, En Prensa (2007).



## **Capítulo VI**

**N-PLS ACOPLADO A RTL: UNA NUEVA HERRAMIENTA  
MULTIDIMENSIONAL PARA EL ESTUDIO DE LOS DATOS DE  
TERCER ORDEN. ANÁLISIS SIMULTÁNEO DE PROCAÍNA Y SU  
METABOLITO ÁCIDO P-AMINO BENZOICO EN SUERO EQUINO**



## VI.1. INTRODUCCIÓN

En este capítulo se propone la determinación del anestésico local procaína y de su metabolito, ácido para-amino benzoico (PABA) (Figura VI.1), en suero equino, empleando diferentes métodos de calibración multivariante de tercer orden. Entre ellos se aplicó, por primera vez, el método N-PLS combinado con RTL, que hemos desarrollado como una extensión de N-PLS con RBL, para una dimensión adicional. Este nuevo algoritmo quimiométrico presenta la ventaja de segundo orden y ha demostrado ser una buena alternativa frente al popular método PARAFAC, que requiere la multilinealidad de los datos.

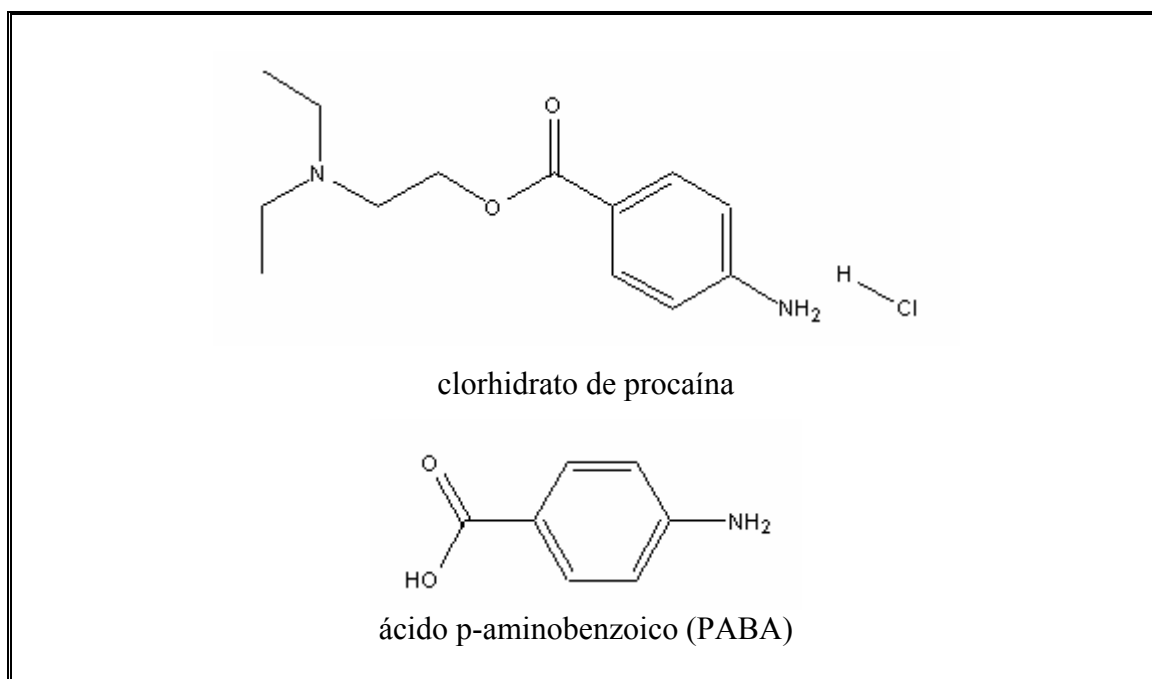


Figura VI.1. Estructura química de Procaína y PABA.

La procaína se emplea como anestésico local y, en el plasma humano, se encuentra completamente hidrolizada en PABA y dietilaminoetanol, debido a la acción de la enzima pseudocolinesterasa [1]. El PABA, tiene efectos en el sistema circulatorio y neurológico, ya que produce constricción en los vasos sanguíneos y euforia [2].

En caballos de competición, la procaína se emplea como anestésico local y como droga estimulante para las carreras y, en plasma equino, podemos encontrar simultáneamente ambos compuestos, procaína y PABA, debido a que en estos animales la hidrólisis de la procaína no se da completamente [3]. Por lo tanto, la determinación simultánea de ambos analitos es importante en la supervisión de deportes de caballos.

El objetivo de este capítulo es probar la capacidad de resolución del método N-PLS acoplado a RTL, en comparación con PARAFAC y otros métodos de calibración susceptibles de procesar datos de tercer orden, y proponer un método para la determinación conjunta de procaína y su principal metabolito, PABA, en suero equino.



## VI.2. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS ANESTÉSICOS LOCALES

Los anestésicos locales son fármacos que, aplicados en concentración suficiente en el correspondiente lugar de acción, impiden la conducción de impulsos eléctricos por las membranas del nervio y el músculo de forma transitoria y reversible, originando la pérdida de sensibilidad en una zona del cuerpo [4].

El primer anestésico local descubierto fue la cocaína, un alcaloide contenido en las hojas de una planta que crece en las montañas andinas, entre 1000 y 3000 metros sobre el nivel del mar, la *Erythroxylon coca*. En 1884, dos jóvenes médicos vieneses, Sigmund Freud y Karl Koller, realizaron uno de los primeros estudios sobre los efectos farmacológicos de la cocaína. Freud notó las importantes reacciones que tenía esta sustancia sobre el SNC y buscando sacar a un colega de la dependencia a la morfina, contribuyó a la creación de uno de los primeros cocainómanos de los tiempos modernos.

La cocaína empezó a utilizarse ampliamente en oftalmología y odontología y, hacia finales del siglo pasado, como anestésico a nivel de la médula espinal. En 1905 se introduce la procaína, un anestésico local sintético prototipo de los actuales.

### ➤ *Fisiología básica de la transmisión nerviosa*

La membrana neural en estado de reposo mantiene una diferencia de voltaje de 60-90 mV entre las caras interna y externa. Es el potencial de reposo. Se mantiene por un mecanismo activo dependiente de energía que es la bomba Na-K, que introduce iones K<sup>+</sup> en el interior celular y extrae iones Na<sup>+</sup> hacia el exterior [5,6]. En esta situación los canales de sodio no permiten el paso de este ión a su través, están en estado de reposo. La membrana se halla polarizada.

Al llegar un estímulo nervioso, se inicia la despolarización de la membrana. El campo eléctrico generado activa los canales de sodio (estado activo), lo que permite el paso a su través de iones  $\text{Na}^+$ , que masivamente pasan al medio intracelular. La negatividad del potencial transmembrana se hace positiva, de unos 10 mV. Cuando la membrana está despolarizada al máximo, disminuye la permeabilidad del canal de sodio, cesando su paso por él de iones  $\text{Na}^+$  (estado inactivo). Entonces, aumenta la permeabilidad del canal de potasio, pasando este ión, por gradiente de concentración, del interior al exterior celular. Posteriormente, se produce una restauración a la fase inicial. Los iones son transportados mediante la bomba Na-K, el  $\text{Na}^+$  hacia el exterior y el  $\text{K}^+$  hacia el interior. Es la repolarización de la membrana, pasando el canal de sodio de estado inactivo a estado de reposo. Estos movimientos iónicos se traducen en cambios en el potencial eléctrico transmembrana, dando lugar al llamado potencial de acción, que se propaga a lo largo de la fibra nerviosa.

Todo este proceso de despolarización-repolarización dura 1 mseg, la despolarización un 30% de este tiempo, mientras que la repolarización es más lenta.

➤ *Mecanismo de acción de los anestésicos locales*

Los anestésicos locales impiden la propagación del impulso nervioso disminuyendo la permeabilidad del canal de sodio, bloqueando así la fase inicial del potencial de acción [5-10]. Para ello, los anestésicos locales deben atravesar la membrana nerviosa, puesto que su acción farmacológica fundamental la llevan a cabo uniéndose al receptor desde el lado citoplasmático de la misma.

Aunque no se sabe aún qué mecanismos exactos son los implicados en estos efectos, se han identificado receptores de anestésicos locales que se relacionan directamente con los canales del sodio y que, al ser bloqueados, impiden el paso de estos iones [11].

Existen muchas sustancias capaces de bloquear la transmisión nerviosa, pero la gran ventaja de los anestésicos locales es que su efecto es reversible.

➤ *Estructura química de los anestésicos locales*

Todos los anestésicos locales responden a una estructura química [4, 7] en común, que se puede dividir en cuatro subunidades (Figura VI.2).

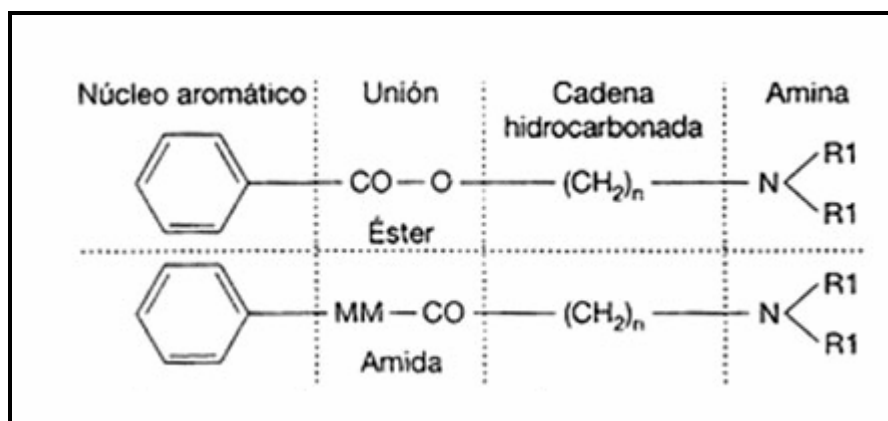


Figura VI.2. Estructura química de los anestésicos locales.

- Subunidad 1, núcleo aromático: es el principal responsable de la liposolubilidad de la molécula. Está formada por un anillo benzénico sustituido. La adición de más grupos a este nivel aumentará la liposolubilidad.
- Subunidad 2, unión éster o amida: es el tipo de unión del núcleo aromático con la cadena hidrocarbonada y determinará el tipo de degradación que sufrirá la molécula: los amino-ésteres son metabolizados por las pseudocolinesterasas plasmáticas y los amino-amidas a nivel hepático, siendo estas últimas más resistentes a las variaciones térmicas.

- Subunidad 3, cadena hidrocarbonada: generalmente es un alcohol con dos átomos de carbono. Influye en la liposolubilidad de la molécula que aumenta con el tamaño de la cadena, en la duración de la acción y en la toxicidad.
- Subunidad 4, grupo amina: es la que determina la hidrosolubilidad de la molécula y su unión a proteínas plasmáticas y lo forma una amina terciaria o cuaternaria. Según los sustituyentes del átomo de nitrógeno variará el carácter hidrosoluble de la molécula.

Otra característica de estas moléculas, excepto de la de lidocaína, es la existencia de un carbono asimétrico, lo que provoca la existencia de dos estereoisómeros "S" o "R", que pueden tener propiedades farmacológicas diferentes en cuanto a capacidad de bloqueo nervioso, toxicidad o de ambos. En general las formas "S" son menos tóxicas. La mayoría de preparados comerciales están disponibles en forma racémica de anestésico local, excepto la ropivacaína, constituida tan solo por el enantiómero S-ropivacaína [12].

La clasificación según su estructura química se recoge en la Tabla VI.1.

*Tabla VI.1. Clasificación de los AL.*

<b>Tipo éster</b>	<b>Tipo amida</b>
- cocaína	- lidocaína
- benzocaína	- mepivacaína
- procaína	- prilocaína
- tetracaína	- bupivacaína
- 2-cloroprocaína	- etidocaína
	- ropivacaína

### **VI.2.1. Características generales de la procaína y del ácido *p*-aminobenzoico**

Como se mencionó anteriormente, la procaína es un medicamento que actúa como anestésico local, ya que bloquea la conducción nerviosa, impidiendo el inicio y la propagación del impulso nervioso.

Fue descubierta en 1905 por A. Einhorn y E. Uhfelder y es llamada comercialmente novocaína, por el laboratorio Hoech, en su fórmula de monoclóhidrato.

Es una sustancia sintética esterificada a partir del ácido para-aminobenzoico y el dietilaminoetanol. Una vez administrada, en presencia de las esterasas, que se encuentran en varios tejidos del cuerpo humano, incluido la sangre, se descompone en cuestión de 20 a 40 minutos en dos compuestos interesantes: el PABA (ácido para-aminobenzoico) y el DEAE (dietil amino etanol), quedando sin ningún efecto tóxico. Por este hecho, es más recomendable que los anestésicos locales de estructura “amida”, cuya eliminación se lleva a cabo exclusivamente en el hígado.

El PABA es un intermediario para la formación de ácido fólico, probablemente el PABA es el elemento de acción principal de esclerosamiento y endurecimiento patológico de los tejidos. No se cree que el PABA sea un nutriente esencial. No obstante, se encuentra presente en alimentos, principalmente en granos y carnes. Generalmente, pequeñas cantidades de PABA están presentes en los complementos de vitamina B así como en algunos multivitamínicos. El DEAE es una sustancia de efectividad sobre la circulación en sentido vaso dilatador, por lo cual produce una disminución de la presión arterial. Se ha comprobado su efecto espasmolítico sobre vasos contraídos y también acción reguladora neurovegetativa.

La Procaína, como ya dijimos, se metaboliza, sobre todo, por las esterasas no específicas existentes en el plasma y, en el hígado, se biotransforma sólo una parte reducida de ésta [13, 14].

Además de su empleo como anestésico local en humanos y animales, la procaína se ha empleado como sustancia dopante en caballos de competición, comportándose como un potente estimulante en équidos. Su empleo como anestésico local coincidió con frecuentes ganadores. En clínica equina se administra 1 gr por vía subcutánea o intramuscular y se elimina en 36 horas [15].

En caballos, la degradación de la procaína en PABA es más lenta que en humanos, pudiendo determinarse simultáneamente ambos compuestos en suero equino [3, 16], permitiendo así su control en los deportes de caballos.

Se han propuesto diversos métodos analíticos para la determinación de procaína o de PABA en diversas muestras [17-25], sin embargo, sólo hemos encontrado tres trabajos en los que se determinan simultáneamente ambos compuestos y, todos ellos, basados en cromatografía líquida [26-28].

En este trabajo, se determina la procaína siguiendo, cinéticamente, su reacción de hidrólisis en medio alcalino, dando lugar a PABA, que es mucho más fluorescente [29]. Para ello, se registraron las matrices de excitación-emisión fluorescentes a lo largo del tiempo de reacción y se analizaron los datos de 4 vías obtenidos con el clásico modelo PARAFAC, el modelo introducido en este trabajo, N-PLS/RTL, y su predecesor U-PLS/RTL. También se comparan las ventajas y desventajas de estas técnicas quimiométricas en lo que concierne a la resolución de la mezcla multicomponente estudiada.

## RESULTADOS Y DISCUSION





### VI.3. ESTUDIOS FLUORIMÉTRICOS Y CINÉTICOS

La procaína (PROCA) sufre un proceso de hidrólisis en medio básico, originando un compuesto altamente fluorescente, el ácido *p*-amino benzoico (PABA). En este apartado, se ha realizado un estudio de la influencia de los distintos parámetros químicos e instrumentales en la cinética de hidrólisis de la procaína y en las propiedades fluorescentes del producto originado.

Se prepararon disoluciones madre de  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de PROCA y de  $60 \text{ mg L}^{-1}$  de PABA en disolución acuosa. Se comprobó que estas disoluciones eran estables en el frigorífico al menos 20 días, no obstante, se mantuvieron en el congelador, donde fueron estables durante al menos 1 mes. Las disoluciones de trabajo se prepararon diariamente.

En la Figura VI.3 se reúnen los espectros de excitación y emisión de PROCA y PABA en disolución acuosa a pH 6. Bajo estas condiciones, los máximos de excitación del PABA se localizaron a 260 y 270 nm y a 340 nm el de emisión. En el caso de la PROCA, el máximo de excitación aparece a 285 nm y el máximo de emisión a 355 nm.

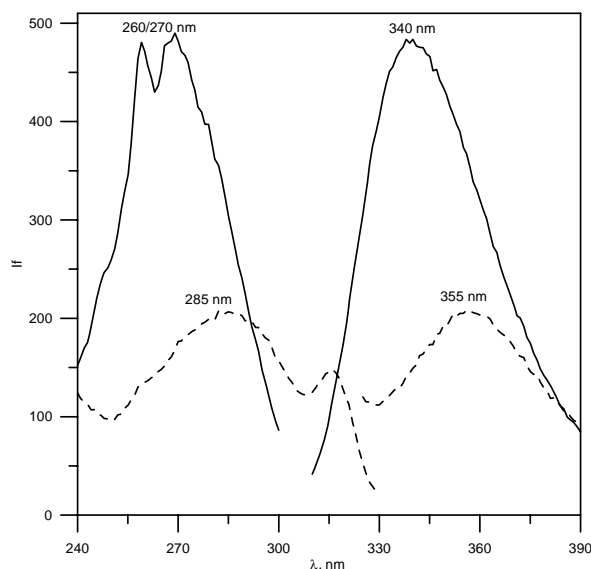


Figura VI.3. Espectros de excitación y emisión fluorescente de  $3.0 \mu\text{g mL}^{-1}$  de PROCA (----) y  $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$  de PABA (—). Condiciones: pH 6;  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ ; Voltaje del fotomultiplicador = 700 V; Rendijas ex/em = 5/5 nm.

En la figura anterior se observa que la intensidad de fluorescencia del PABA es mucho mayor que la de la PROCA, lo que hace conveniente su determinación indirecta.

En la Figura VI.4, se muestran los espectros fluorescentes de una disolución de PABA  $4.4 \times 10^{-6}$  M y del producto de hidrólisis de una disolución  $2.5 \times 10^{-6}$  M de PROCA en medio alcalino, obtenido con  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.1 M/NaOH 17 M, a temperatura ambiente.

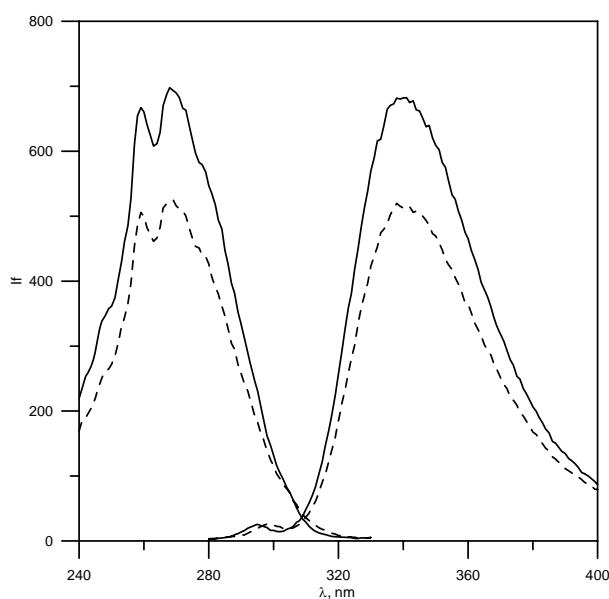


Figura VI.4. Espectros de excitación y emisión fluorescente del producto de hidrólisis de  $0.6 \mu\text{g mL}^{-1}$  de PROCA (-----) y  $0.6 \mu\text{g mL}^{-1}$  de PABA (—). Condiciones:  $\lambda_{exc} = 270 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 340 \text{ nm}$ ; pH 13;  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ ; Voltaje del fotomultiplicador = 700 V; Rendijas ex/em = 5/5 nm.

En primer lugar, se estudió la influencia de distintos parámetros químicos e instrumentales que influyen en esta reacción de hidrólisis, con el objetivo final de que el PABA sea lo más fluorescente posible y la hidrólisis transcurra a una velocidad adecuada para poder registrar la evolución de las matrices de excitación-emisión con el tiempo (EEMs).

### **VI.3.1. Optimización de condiciones químicas y parámetros instrumentales**

Los estudios cinéticos de la hidrólisis de PROCA se llevaron a cabo mezclando manualmente los reactivos en la cubeta de medida del espectrofluorímetro y registrando las correspondientes curvas cinéticas de desarrollo de la fluorescencia, así como los espectros fluorescentes de los productos de oxidación generados.

Las variables experimentales optimizadas fueron el pH, la fuerza iónica y la temperatura.

#### ➤ *Influencia del pH*

Para llevar a cabo este estudio, se preparan disoluciones de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1 M, siendo el pH 9.2 y se añadieron gotas de NaOH 17 M hasta llevar el pH al valor deseado y, en último lugar, se añadió PROCA directamente en la cubeta de medida.

La temperatura se mantuvo a 25 °C y las condiciones instrumentales que se fijaron fueron las siguientes:  $\lambda_{\text{exc}} = 270 \text{ nm}$  y  $\lambda_{\text{em}} = 340 \text{ nm}$ ; 700 V; Rendijas ex/em = 5/5 nm.. Se registraron las curvas cinéticas durante 30 minutos.

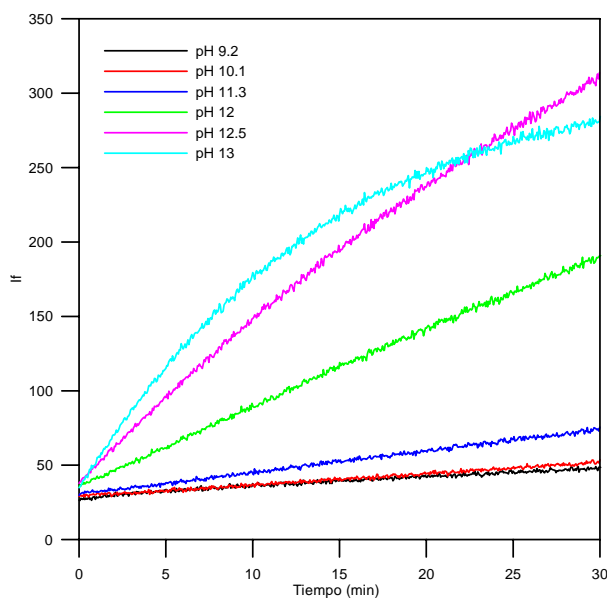


Figura VI.5. Curvas cinéticas de la hidrólisis de  $1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$  de PROCA obtenidas modificando el pH del medio.

Se observó que al aumentar la basicidad del medio se favorecía la cinética de hidrólisis de PROCA, por lo que se seleccionó un pH de 13 para llevar a cabo este estudio. Además, a este valor de pH, la intensidad fluorescente del producto originado es la mayor hasta un tiempo aproximado de 22 minutos, que será suficiente para seguir la cinética de hidrólisis de PROCA.

➤ *Fuerza iónica del medio*

Se probó a fijar el pH 13 con  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.1 M, añadiendo NaOH 17 M hasta alcanzar pH 13 y, directamente, con NaOH 0.1 M.

La temperatura se mantuvo a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  y las condiciones instrumentales que se fijaron fueron las siguientes:  $\lambda_{\text{exc}} = 270 \text{ nm}$  y  $\lambda_{\text{em}} = 340 \text{ nm}$ ; 700 VI; Rendijas ex/em = 5/5 nm. Se registraron las curvas cinéticas durante 30 minutos, Figura VI.6.

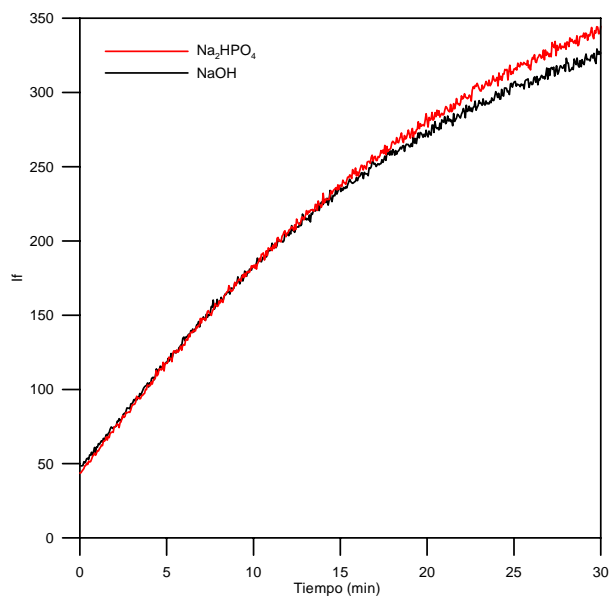


Figura VI.6. Curvas cinéticas de la hidrólisis de  $1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$  de PROCA fijando el pH 13 con NaOH y  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaOH}$ .

No se observaron diferencias significativas entre ambas curvas, por lo que se fijó la basicidad del medio con NaOH 0.1 M directamente, ya que es más sencillo y se obtienen los mismos resultados que con  $\text{Na}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ .

➤ *Influencia de la temperatura*

Se estudió la influencia de la temperatura en la cinética de hidrólisis de PROCA registrando las curvas cinéticas entre los 13 y 46 °C.

Las disoluciones se prepararon directamente en la cubeta de medida, que contenía NaOH 0.1 M y añadiendo PROCA, siendo su concentración final  $1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Las condiciones fijadas en el espectrofluorímetro fueron las mismas que en ensayos anteriores. En la Figura VI.7 se muestran las curvas cinéticas registradas.

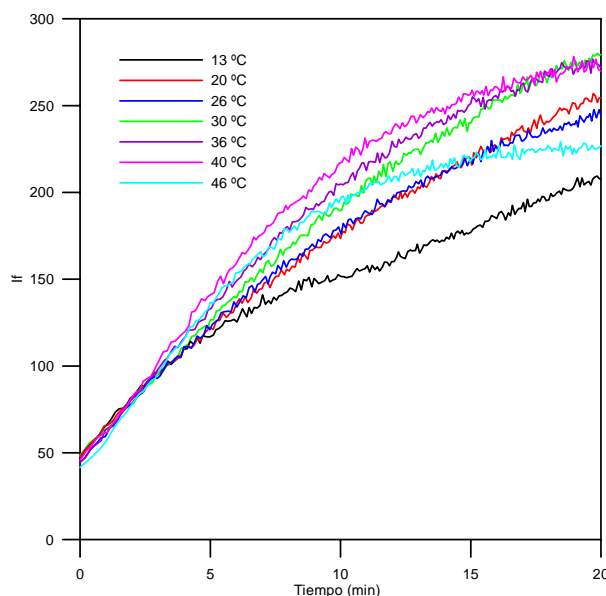


Figura VI.7. Curvas cinéticas de la hidrólisis de  $1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$  de PROCA obtenidas a distintas temperaturas.

Como cabe esperar, la velocidad de reacción aumenta con la temperatura y se puede observar que, a  $46 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , la reacción finaliza en menor tiempo y disminuye la emisión de fluorescencia del PABA, pues a mayor temperatura, existe mayor probabilidad de desactivación del estado excitado por mecanismos de desactivación no radiante. Por lo tanto, se seleccionó  $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$  como valor óptimo de temperatura.

En la Tabla VI.2 se recogen las condiciones químicas e instrumentales óptimas.

Tabla VI.2. Condiciones experimentales óptimas.

Condiciones óptimas en la cubeta de medida	Condiciones instrumentales óptimas
[PROCA] = variable	$\lambda_{\text{ex}} = 270 \text{ nm}$
[PABA] = variable	$\lambda_{\text{em}} = 340 \text{ nm}$
pH = 13	Rendijas ex/em = 5/5 nm
[NaOH] = 0.1 M	Voltaje = 700 V
	Temperatura = $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$

### VI.3.2. Estudio de la linealidad y aditividad de las señales

Se estudió la linealidad entre la concentración de PROCA y la intensidad de fluorescencia del máximo de emisión (340 nm) del producto de hidrólisis formado en medio básico, después de 30 minutos, asegurándonos que la reacción ha finalizado completamente, Figura VI.8.A. En la Figura VI.8.B se representa la relación entre la concentración de PABA y su intensidad de fluorescencia en el máximo de emisión (340 nm) en las mismas condiciones, es decir, en medio básico, a los 30 minutos (bajo estas condiciones no hay variación en las propiedades fluorescentes de PABA).

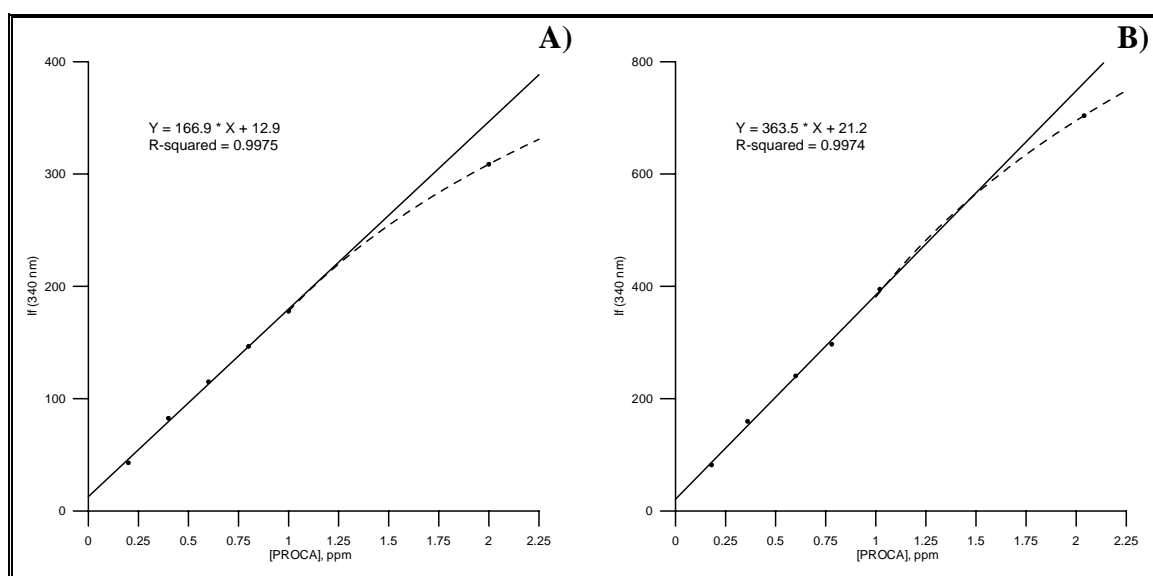


Figura VI.8. Influencia de la concentración de PROCA en la fluorescencia de su producto de hidrólisis a los 30 minutos de reacción (A) y de la concentración de PABA en su intensidad de fluorescencia (B). Condiciones:  $\lambda_{ex/em} = 270/340$  nm;  $[NaOH] = 0.1$  M;  $pH = 13$ ;  $40$  °C; Voltaje del fotomultiplicador = 600 V; Rendijas  $ex/em = 5/5$  nm.

En la Figura VI.8, se observa que, la fluorescencia de PABA y del producto de hidrólisis de PROCA, aumentan con la concentración de forma lineal hasta un valor aproximado de  $1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

A partir de los rangos de linealidad obtenidos y, teniendo en cuenta los niveles terapéuticos de la PROCA y la relación de pesos moleculares entre ambos compuestos (ya que PROCA se transforma en PABA mediante hidrólisis alcalina), se emplearán concentraciones de PROCA entre 0-0.9  $\mu\text{g mL}^{-1}$  y de PABA entre 0-0.6  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para realizar este estudio.

Antes de realizar la matriz de calibración, estudiamos la aditividad de la señal fluorescente registrando las curvas cinéticas de una disolución que contiene 1.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de PROCA, otra disolución que contiene 0.6  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de PABA y, finalmente, una disolución que contiene 1.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de PROCA y 0.6  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de PABA. En la Figura VI.9 se muestran estas curvas cinéticas, donde podemos comprobar que la disolución de PABA no sufre ningún tipo de reacción bajo las condiciones establecidas, manteniéndose constante la fluorescencia en todo el intervalo y que, la hidrólisis de PROCA, finaliza aproximadamente a los 30 minutos. También comprobamos la aditividad de las señales en todo el intervalo, aunque en los minutos iniciales hay alguna desviación debido probablemente a la estabilización de las disoluciones a la temperatura del portacubetas.

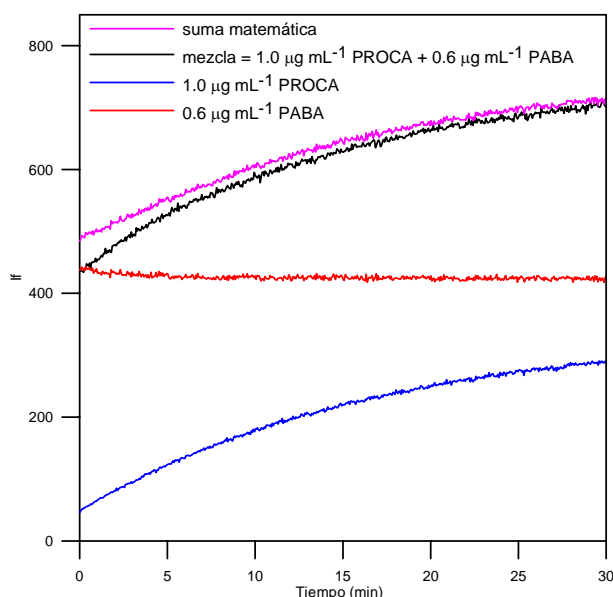


Figura VI.9. Curvas cinéticas registradas a  $270_{ex}/340_{ex}$  nm;  $[\text{NaOH}] = 0.1$  M;  $\text{pH} = 13$ ,  $40$  °C, Voltaje del fotomultiplicador = 700 V; Rendijas ex/em = 5/5 nm.



#### **VI.4. DETERMINACIÓN DE PROCAÍNA Y ÁCIDO *p*-AMINO BENZOICO EMPLEANDO DATOS DE TERCER ORDEN**

Como se ha explicado en capítulos anteriores, la utilización de datos de cuatro vías ofrece la posibilidad de introducir una dimensión adicional al conjunto de datos de tres vías, permitiendo un incremento teórico de la selectividad y aportando métodos que sean aún más robustos frente a la presencia de interferencias y a los efectos de matriz.

En el capítulo II, se presentó una nueva herramienta quimiométrica para estudiar datos de tercer orden que presenta la “ventaja de segundo orden”, N-PLS/RTL, y se aplicará, por primera vez, en la determinación simultánea de procaína y ácido *p*-amino benzoico en muestras de suero equino.

Todos los cálculos se realizaron empleando el programa informático MVIC3 (Multivariate Calibration for Third-Order), que ha sido modificado para introducir este nuevo algoritmo.

Los datos de tercer orden que se emplearán son la evolución en el tiempo de las matrices de excitación-emisión fluorescente (EEMs) de la mezcla estudiada, bajo las condiciones previamente optimizadas. Con objeto de evitar incluir dispersiones, se seleccionaron las zonas de 240 a 300 nm, con un incremento de 6 nm, para excitación, y de 310 a 390 nm, con un incremento de 4 nm, para emisión. Se registraron las EEMs durante 18 minutos, una cada 2 minutos. Así, una matriz de tercer orden tiene un tamaño de 11x21x10, con un total de 2310 puntos experimentales. El espectrofluorímetro de barrido rápido, permite la adquisición de una matriz EEM completa en 0.2 minutos, utilizando una velocidad de barrido de 24000 nm/min. Así, el tiempo que se tarda en obtener la matriz de datos completa, es considerablemente menor que el tiempo entre medidas sucesivas. Estas consideraciones son importantes, pues hay que tener en cuenta, que si la reacción transcurriera de una manera significativa durante la adquisición espectral, los datos obtenidos para una determinada muestra, no serían estrictamente cuatrilíneales.

En la Figura VI.10 se muestran los mapas de contorno de las EEM de una disolución de PABA y de PROCA, cuya hidrólisis en medio básico genera PABA, como se puede observar en la Figura VI.11.

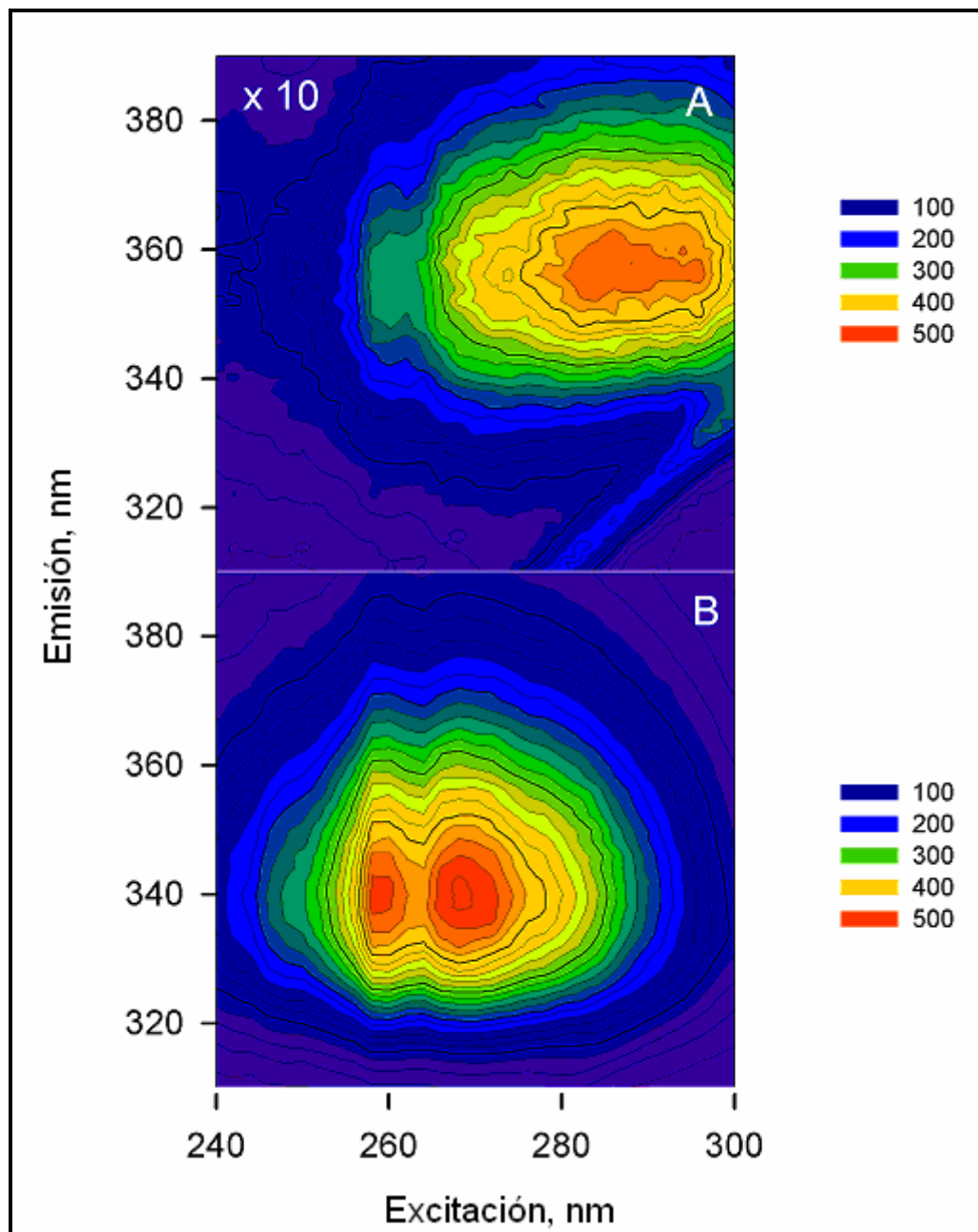


Figura VI.10. A) Mapa de contorno de la EEM de una disolución de PROCA ( $0.9 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) a pH 5.0 para evitar la hidrólisis. Las intensidades han sido multiplicadas por un factor de 10. B) Mapa de contorno de la EEM de una disolución de PABA ( $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) a pH 13.

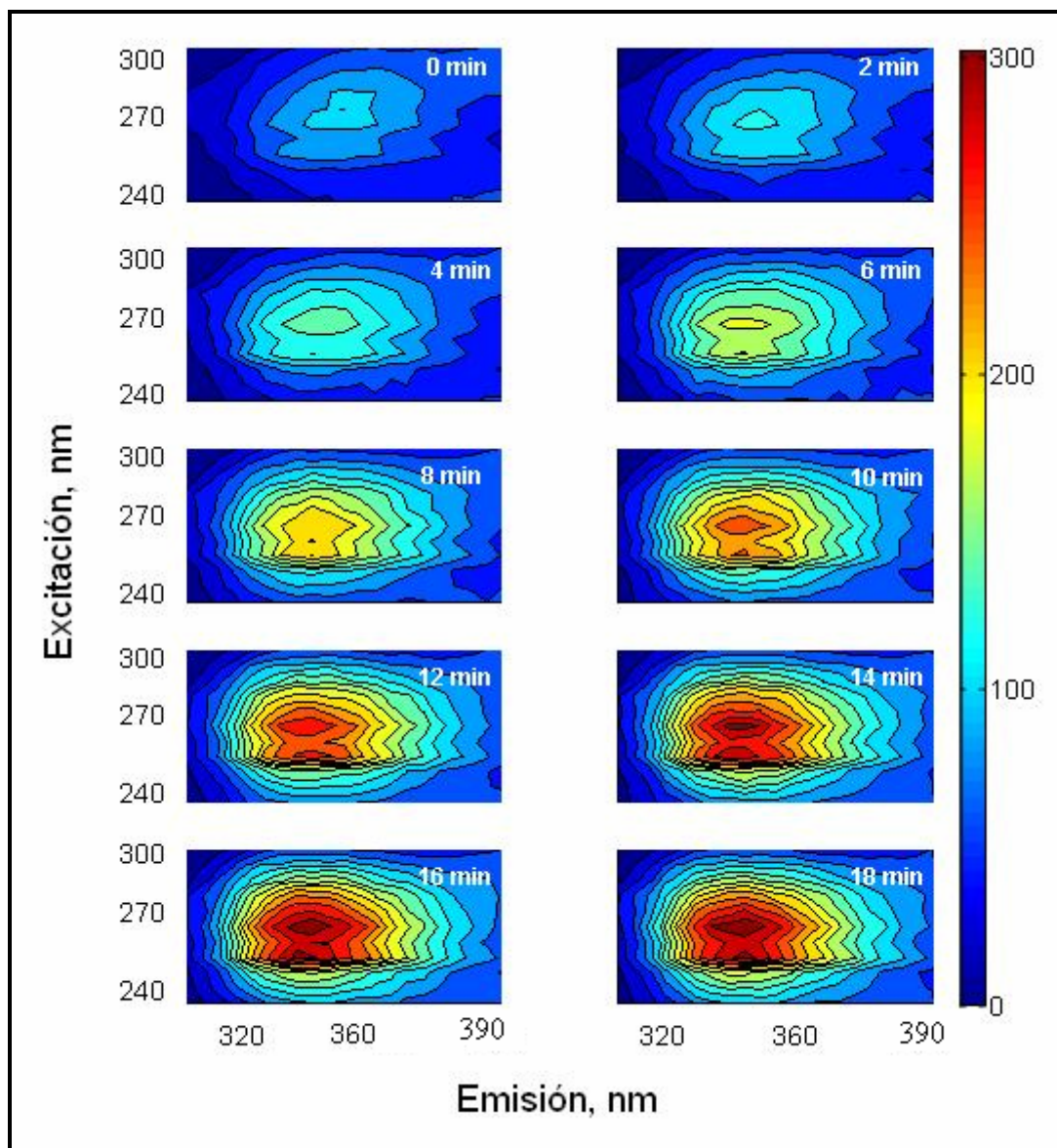


Figura VI.11. Mapas de contorno de las EEMs en función del tiempo de una disolución de PROCA ( $0.7 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) a pH 13.

### VI.4.1. Conjunto de calibración y de validación

Para realizar la calibración, se siguió un diseño central compuesto con tres réplicas del punto central, con lo que el número total de muestras necesarias para construir el modelo es once (P1-P11). Como dijimos anteriormente, los rangos de concentración de PROCA y PABA empleados fueron entre 0-0.9  $\mu\text{g mL}^{-1}$  y 0-0.6  $\mu\text{g mL}^{-1}$  respectivamente. Los valores de concentración empleados se recogen en la Tabla VI.3 y, en la Figura VI.12, se puede ver cómo se distribuyen los patrones de la matriz de calibración.

Tabla VI.3. Composición de la matriz de calibración.

Patrón	[PROCA], $\mu\text{g mL}^{-1}$	[PABA], $\mu\text{g mL}^{-1}$
P1	0.146	0.088
P2	0.146	0.512
P3	0.854	0.880
P4	0.854	0.512
P5	0.500	0.000
P6	0.500	0.600
P7	0.000	0.300
P8	1.000	0.300
P9	0.500	0.300
P10	0.500	0.300
P11	0.500	0.300

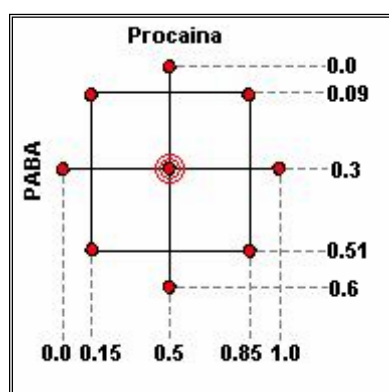


Figura VI.12. Representación de la matriz de calibración: diseño central compuesto con tres réplicas del punto central.

También se prepararon nueve muestras formadas por mezclas binarias con concentraciones de los analitos diferentes de las empleadas para la calibración, pero dentro de los mismos intervalos de concentraciones. Este grupo de muestras, Tabla VI.4, se utilizó para validar el modelo.

➤ ***Calibración multivariante empleando PARAFAC, N-PLS, U-PLS y TLLS***

Bajo las condiciones anteriormente descritas, se registraron las EEM del conjunto de calibración y de validación.

Para determinar el número óptimo de factores empleando PARAFAC, se aplicó el procedimiento denominado *análisis de la consistencia del núcleo* (core consistency) [30]. Sin embargo, en el sistema que estamos estudiando, se observa una gran correlación entre la concentración de PROCA y la que se va formando de PABA durante la hidrólisis. En este caso, el análisis del core consistency no puede aplicarse y, debemos determinar el número óptimo de factores, basándonos en nuestra experiencia previa. Asimismo, para aplicar satisfactoriamente PARAFAC al presente sistema, se necesitó inicializar con los loadings espectrales y de tiempo que contuvieran información previamente registrada de PABA, que es la especie más fluorescente de las muestras. Además, fue necesario introducir la restricción de no negatividad en las 4 vías (excitación, emisión, tiempo y concentración), durante la etapa de ajuste de PARAFAC, una práctica común cuando aparecen problemas de dependencia lineal [31, 32].

Para analizar el conjunto de muestras de validación, se consideró un número óptimo de factores igual a 2, aunque la respuesta medida se debe únicamente a una especie, PABA (presente originalmente en las muestras y producido de la hidrólisis de PROCA), ya que la fluorescencia de la PROCA es muy débil (Figura VI.10).

Imponiendo las restricciones algorítmicas ya mencionadas, ambas contribuciones de PABA se pueden distinguir por PARAFAC, ya que presentan evoluciones distintas en el tiempo.

En la Figura VI.13 se muestran los perfiles obtenidos para una muestra del conjunto de validación al aplicar PARAFAC. Como se puede observar, los perfiles de emisión y excitación son idénticos para ambos componentes y coinciden con las propiedades espectrales de PABA. Sin embargo, los perfiles temporales son distintos para ambos componentes: para el primer componente se obtiene un perfil en el que disminuye la fluorescencia con el tiempo, mientras que para el componente 2 aumenta.

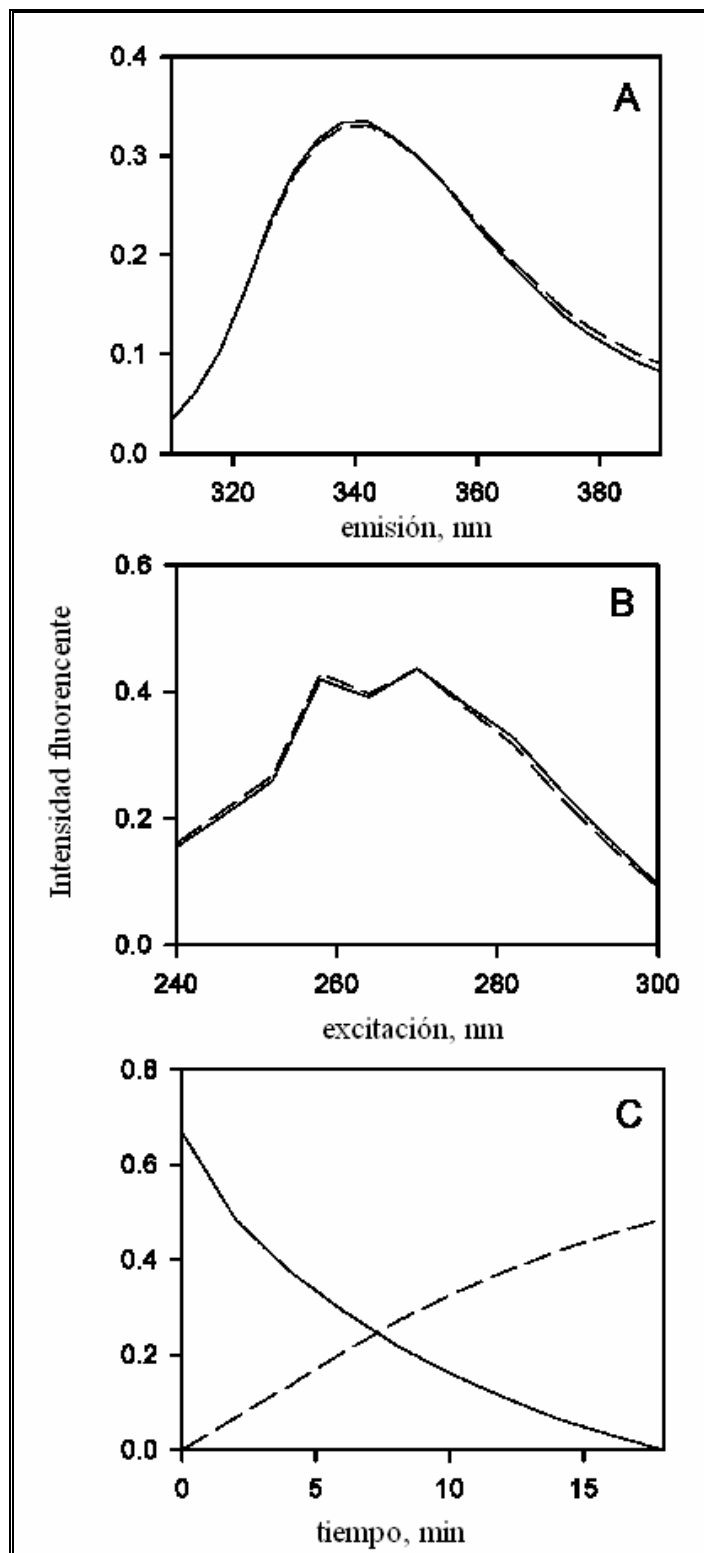


Figura VI.13. Perfiles espectrales obtenidos con PARAFAC al procesar una muestra del conjunto de validación ( $218 \text{ ng mL}^{-1}$ ) y PABA ( $456 \text{ ng mL}^{-1}$ ). Componente 1 de PARAFAC (—), componente 2 de PARAFAC (- - -). A) Perfiles de emisión. B) Perfiles de excitación. C) Perfiles de tiempo. Todos los perfiles están normalizados a la unidad.

Los perfiles temporales obtenidos no coinciden con los que esperábamos, que serían, en base al fenómeno estudiado, una señal constante debida al PABA originalmente presente en la disolución y una señal cada vez mayor debida al PABA que se origina por la hidrólisis de la PROCA.

Estos perfiles temporales inesperados sugieren la existencia de combinaciones lineales en el tiempo, que se traducen en correlaciones en la matriz de los scores **A** de PARAFAC, que contiene las concentraciones relativas de los componentes (la descomposición de los datos de cuatro vías nos proporciona los perfiles en las tres dimensiones que se recogen en las matrices **B**, **C** y **D**). Estas correlaciones causan que, los gráficos de calibración pseudo-univariate obtenidos para cada analito, no presenten las características esperadas con respecto a sus concentraciones nominales. Este fenómeno se puede observar en la Figura VI.14, donde se muestra claramente que ninguno de los scores de **A** se relaciona linealmente con la concentración de PROCA, aunque uno de ellos (Figura VI.14.C) proporciona un diseño central compuesto distorsionado (típico cuando existen fenómenos de dependencia lineal entre analitos). Mientras que la correlación de los scores de **A** con la concentración de PABA es aparentemente lineal (Figura VI.14.B), aunque indica la presencia de una intercepción significativa.



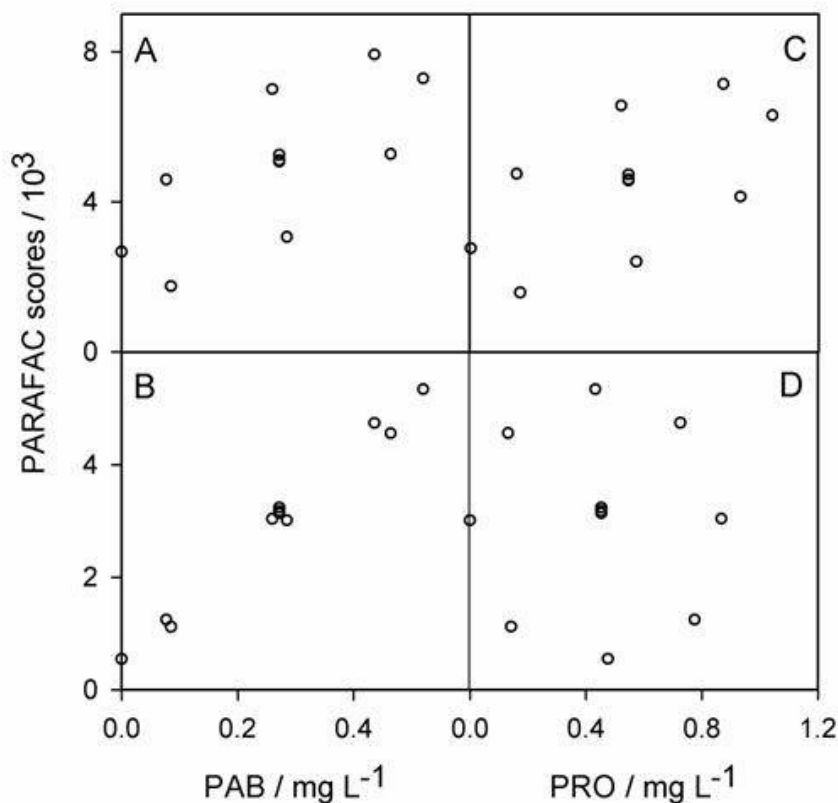


Figura VI.14. Matriz de scores **A**, de PARAFAC, en función de la concentración nominal de cada analito en el conjunto de muestras de calibración, después de procesar una muestra de validación. A) Primera columna de la matriz de scores **A** en función de las concentraciones de PABA en la matriz de calibración. B) Segunda columna de **A** en función de las concentraciones de PABA. C) Primera columna de **A** en función de las concentraciones de PROCA. D) Segunda columna de **A** en función de las concentraciones de PROCA.

Un alternativa para intentar resolver el problema de dependencia lineal mencionado, es correlacionar las columnas de **A** con las concentraciones de cada analito mediante el análisis de regresión multilinear (MLR), en vez de la metodología pseudo-univariante clásica. Esto se ha aplicado previamente para modelar una cinética empleando datos fluorescentes de cuatro vías [33]. Cuando se procesaron los resultados de PARAFAC de este modo, se pudieron predecir las concentraciones de ambos analitos en las muestras de validación, obteniendo resultados razonables, Tabla VI.4.

Al aplicar N-PLS y U-PLS, se realizó validación cruzada para el conjunto de patrones de calibración y, de acuerdo con el criterio de Haaland y Thomas [34], se obtuvo un número óptimo de factores igual a 2. En el caso de TLLS, se empleó un número de factores igual al número de analitos calibrados (2 en este caso).

Con ninguno de estos tres métodos fue necesario emplear el procedimiento separado de RTL para analizar las muestras de validación, puesto que no contienen interferentes inesperados. En este sentido, el uso de N-PLS, U-PLS y TLLS para estudiar las muestras de validación es considerablemente más simple que PARAFAC, ya que no requieren ninguna condición o restricción especial de inicialización. Los resultados obtenidos al aplicar N-PLS al conjunto de validación se reúnen en la Tabla VI.4., y son similares a los obtenidos mediante U-PLS y TLLS, y mejores que los obtenidos mediante PARAFAC en lo que concierne al contenido de PROCA.

La mejor capacidad predictiva de N-PLS se puede relacionar con su estructura interna más flexible, en comparación con PARAFAC, por lo que puede modelar datos de cuatro vías que no sean estrictamente cuatrilíneas [35]. Debemos tener en cuenta que estamos estudiando un proceso cinético y, por lo tanto, la sincronización exacta de las medidas instrumentales puede ser crucial para el éxito de un algoritmo determinado. Algunas de las causas que pueden causar pérdida de multilinealidad de los datos son: 1) el tiempo necesario para registrar la EEM completa de una muestra en comparación con el progreso de la reacción, y 2) el hecho de que los analitos estudiados son el reactivo y el producto de la reacción de hidrólisis y, cuando estudiamos una reacción, si bien el reactivo y el producto pueden dar una señal que es multilineal, la señal global (suma de ambas) puede dejar de ser multilineal por cuestiones de dependencia lineal entre los perfiles temporales. Estas dos fuentes de pérdida de multilinealidad pueden afectar seriamente a PARAFAC, que es el algoritmo menos robusto, en comparación con la metodología de N-PLS/RTL.

Tabla VI.4. Resultados obtenidos al analizar el conjunto de validación con los diferentes algoritmos.

<b>PROCAÍNA</b>				
Nominal (ng mL <sup>-1</sup> )	Predicha (ng mL <sup>-1</sup> )			
	PARAFAC	N-PLS	TLLS	U-PLS
218	221	223	221	225
607	602	603	607	603
587	583	595	598	595
251	284	275	275	275
657	683	684	687	681
390	414	401	402	401
700	722	724	728	722
668	672	674	678	672
263	273	259	258	260
<b>RMSEP<sup>a</sup> (ng mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>18</b>	<b>15</b>	<b>17</b>	<b>14</b>
<b>REP<sup>b</sup>, %</b>	<b>4.0</b>	<b>3.3</b>	<b>3.8</b>	<b>3.1</b>
<b>ÁCIDO <i>p</i>-AMINO BENZOICO</b>				
Nominal (ng mL <sup>-1</sup> )	Predicha (ng mL <sup>-1</sup> )			
	PARAFAC	N-PLS	TLLS	U-PLS
456	473	469	475	469
307	299	307	304	307
484	475	489	487	489
233	243	233	237	233
290	287	300	295	300
167	170	165	166	165
383	367	385	380	386
394	392	410	406	410
170	185	173	177	173
<b>RMSEP<sup>a</sup> (ng mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>11</b>	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>8</b>
<b>REP<sup>b</sup>, %</b>	<b>3.7</b>	<b>2.7</b>	<b>2.7</b>	<b>2.7</b>

<sup>a</sup>RMSEP = raíz cuadrada de la media de los errores de predicción al cuadrado

<sup>b</sup>REP% = error relativo de predicción.

Se aplicó el test de la elipse, EJCR, para comparar los valores de concentración predichos por cada método con los valores teóricos de ambos analitos, con objeto de averiguar si existen diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95 %. Las elipses obtenidas se muestran en la Figura VI.15.

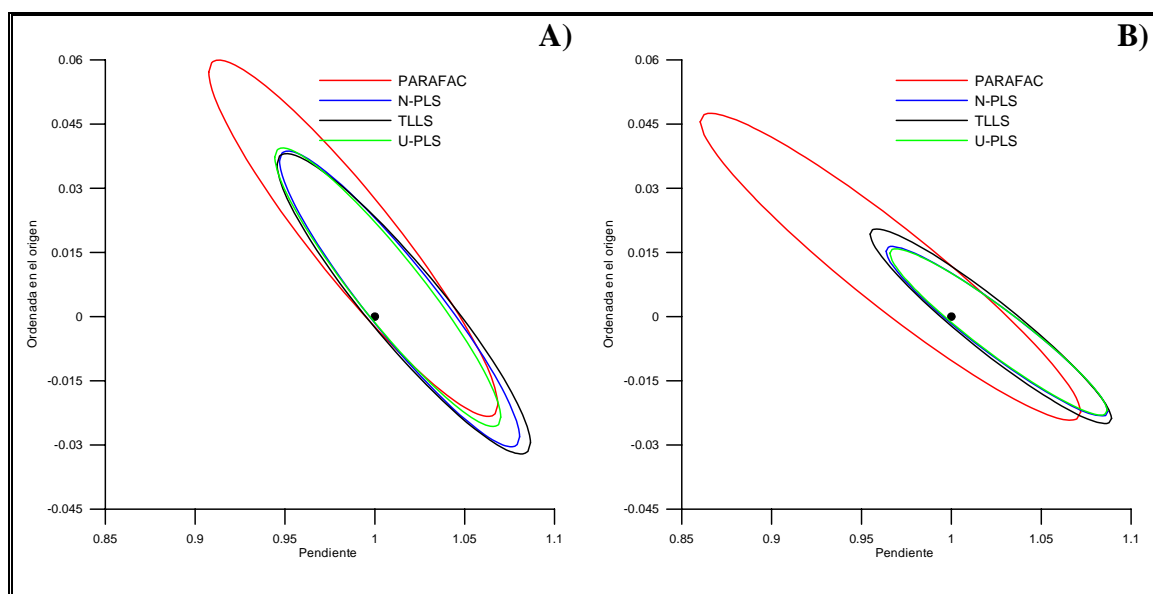


Figura VI.15. EJCR al comparar las concentraciones teóricas con las predichas por los distintos métodos para la procaína (A) y el ácido *p*-aminobenzoico (B) en las muestras del conjunto de validación.

Se puede comprobar como, en todos los casos, el punto teórico (1, 0) está dentro de las elipses, lo que nos indica la precisión de estos métodos, no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones teóricas y las predichas para ambos analitos al nivel de confianza elegido. Con respecto al mayor tamaño de las elipses obtenidas con PARAFAC, para ambos analitos, se puede decir que es la metodología que menor capacidad predictiva presenta. Además, para todos los métodos aplicados, las predicciones de PABA son más precisas que las de PROCA.

Después de aplicar los distintos métodos de calibración de tercer orden en la resolución de la mezcla de PROCA y su metabolito, PABA, en muestras sintéticas, se

procedió a su ensayo en muestras de suero equino y, para ello, se emplearán las mismas herramientas quimiométricas.

#### **VI.4.2. Determinación de PROCA y PABA en suero equino**

El laboratorio veterinario del hipódromo de Rosario, Argentina, nos proporcionó las muestras de suero y, en primer lugar, estudiamos diferentes procedimientos para precipitar las proteínas presentes, con objeto de obtener un suero lo más limpio posible, que proporcione la menor señal.

Los agentes desproteneizantes que se estudiaron fueron: ácido fosfotúngstico, metanol y ácido tricloroacético. Para ello, registramos los espectros de absorción UVI-Visible y espectros fluorescentes del suero de caballo tratado con cada uno de estos reactivos desproteneizantes y alcalinizado, con NaOH, hasta pH 13.

Se preparó el ácido fosfotúngstico partiendo de 4 gr de tungstato de sodio bihidratado ( $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) que se disolvieron en 30 mL de agua. Se añadieron 3.2 mL de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  al 85 % y se mantuvo la disolución a reflujo durante 2 horas. Pasado este tiempo, se dejó enfriar la disolución y se añadieron 100 mL más de agua y 3.2 mL de  $\text{LiSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ . La disolución se conservó en un frasco de vidrio de color topacio [36].

El modo operatorio empleado para desproteneizar el suero empleando el ácido fosfotúngstico fue el siguiente:

- 1) En un tubo de centrifugación añadimos:
  - 0.5 mL de suero.
  - 0.5 mL de ácido fosfotúngstico.
  - 4 mL de agua.
  
- 2) Se centrifuga la muestra durante 5 minutos a 3000 rpm.

- 3) Tomamos 0.5 mL del sobrenadante, que llevamos a un matraz de 5 mL y diluimos con NaOH 0.1 M hasta enrase.

De este modo, la dilución final del suero fue de 100 veces y, en la Figura VI.16, se muestra el espectro de absorción molecular obtenido, donde se ve la elevada absorbancia de la muestra en el intervalo espectral de análisis de los analitos, por lo que descartamos este procedimiento para tratar el suero, ya que probablemente obtendríamos un importante fenómeno de filtro interno.

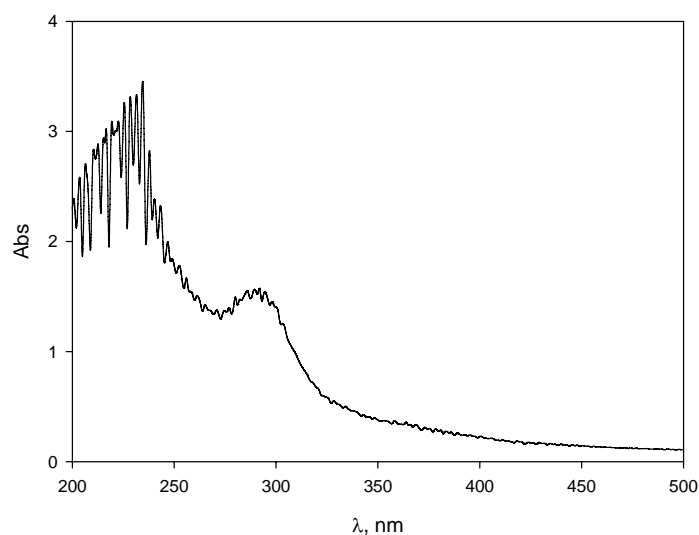


Figura VI.16. Espectro de absorción de una muestra de suero equino sometida a un proceso de desproteneización con *ác. fosfotúngstico*. Dilución final = 100.

Empleando metanol (MeOH) o ácido tricloroacético (TCA), se siguió el procedimiento que se detalla a continuación, probando distintas diluciones del suero, teniendo en cuenta el rango terapéutico de los analitos:

- 1) En un tubo de centrifugación añadimos:
  - 0.5 mL de suero.
  - TCA al 2 % (v/v) o MeOH (se ensayaron volúmenes entre 0.5 y 2.5 mL).

- 2) Se centrifuga la muestra durante 5 minutos a 3000 rpm.
- 3) Tomamos 0.5 mL del sobrenadante, que llevamos a un matraz de 5 mL y diluimos con NaOH 0.1 M hasta enrase.

La dilución final del suero fue entre 20 y 60 veces y, en la Figura VI.16, se muestran algunos de los espectros de absorción molecular obtenidos con ambos agentes desproteneizantes.

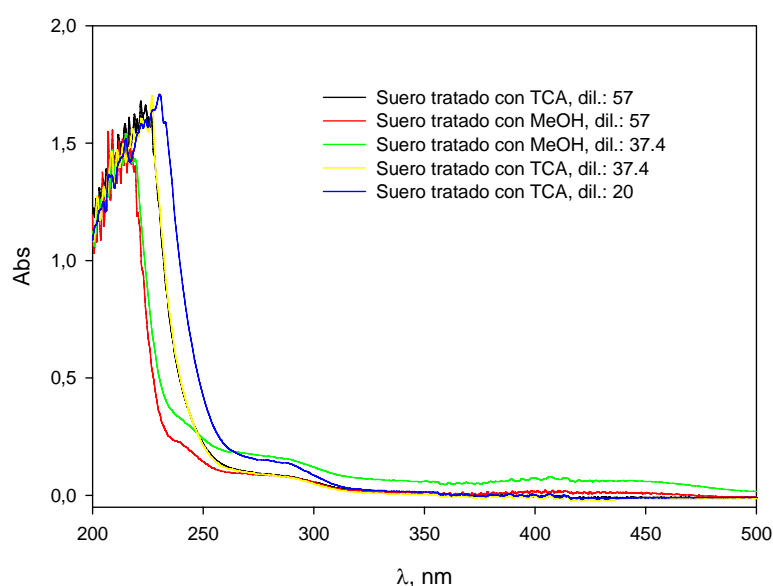


Figura VI.17. Espectros de absorción de muestras de suero equino sometidas a procesos de desproteneización con TCA y MeOH.

Empleando metanol o ácido tricloroacético el suero presenta menor absorbancia, de modo que el efecto de filtro interno será menor, en ambos casos, respecto al ácido fosfotúngstico. Además, se decidió emplear ácido tricloroacético como agente desproteneizante, ya que realizando una menor dilución, se consigue un suero más limpio, como se puede ver más claramente en la Figura VI.18, donde se amplían los espectros de absorción anteriores para una muestra de suero tratado con TCA y MeOH, diluida 20 y 37 veces respectivamente.

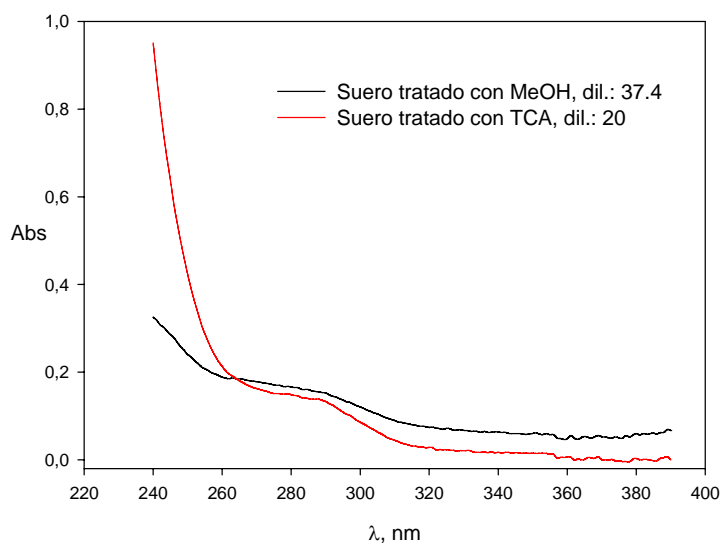


Figura VI.18. Espectros de absorbancia de muestras de suero equino sometidas a procesos de desproteneización con TCA (dilución = 20) y MeOH (dilución = 37).

El procedimiento finalmente empleado fue el siguiente:

- 1) En un tubo de centrifugación añadimos:
  - 0.5 mL de suero.
  - 1.5 mL de TCA al 2 % (v/v).
- 2) Se centrifuga la muestra durante 5 minutos a 3000 rpm.
- 3) Tomamos 0.4 mL del sobrenadante, y lo diluimos con NaOH hasta un volumen final de 2 mL en la cubeta de medida del espectrofluorímetro.

De este modo, el suero equino se somete a una dilución de 20 veces y, teniendo en cuenta los rangos de calibración empleados, podemos determinar PROCA y PABA hasta concentraciones de 20 y 12 mg L<sup>-1</sup> respectivamente, siendo estos valores comparables con los encontrados en suero de caballo [37].



En la Figura VI.19 se muestra el mapa de contorno de una EEM de una muestra de suero sin contaminar, sometida al tratamiento previamente descrito. Podemos comparar la intensidad de fluorescencia de esta muestra con la de PROCA, Figura VI.10, observando que es mucho mayor, lo que dificultará su determinación.

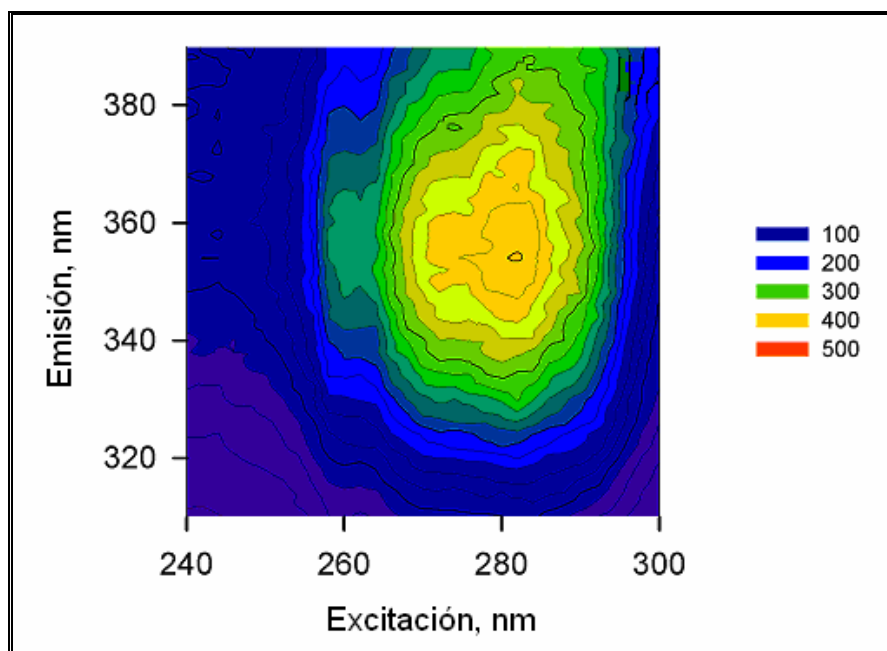


Figura VI.19. Mapa de contorno de una EEM de una muestra de suero equino desproteínizada y diluida 20 veces, a pH 13.

Después de realizar este estudio, se procedió a contaminar las muestras de suero con los analitos de interés, para registrar la evolución de las EEMs con el tiempo y predecir las concentraciones de ambos, empleando los métodos de calibración multivariante de tercer orden mencionados.

Para ello, se prepararon dos conjuntos de muestras, el primero (T1) estaba formado por muestras de suero equino que contenían cinco niveles de concentración de PROCA (cada muestra se preparó por duplicado) y fue empleado para estimar el grado de la recuperación de PROCA después del proceso de desproteínización. Estas muestras (T1) no contenían PABA. El segundo conjunto (T2), estaba formado por cinco muestras

de suero equino contaminadas con ambos analitos y se preparó con el propósito específico de evaluar la capacidad predictiva de los distintos algoritmos. Cada muestra de T2 se preparó por duplicado.

➤ ***Aplicación de PARAFAC***

Al igual que para el análisis del conjunto de validación, para aplicar satisfactoriamente PARAFAC al presente sistema, fue necesario fijar condiciones de inicialización y también introducir la restricción de no negatividad durante la etapa de ajuste de mínimos cuadrados. De nuevo, no pudo aplicarse el análisis del core consistency para determinar el número óptimo de factores, por lo que se analizaron los errores de regresión de la calibración lineal pseudo-univariante, que se obtenían al emplear un número de componentes crecientes a partir de 2, que es el número de analitos estudiados, y se compararon con el nivel de ruido instrumental [38]. Usando este procedimiento, todas las muestras estudiadas requirieron el empleo de tres componentes, que se atribuyen a: 1) el PABA originalmente presente en las muestras, 2) el PABA producido por la hidrólisis de PROCA, y 3) el fondo del suero.

En las Figuras VI.20.A y VI.20.B, se observa que PARAFAC proporciona correctamente los perfiles espectrales (excitación y emisión) de una muestra de suero sin contaminar, ya que coinciden con los obtenidos al registrar dicha muestra.

En la Figura VI.20.C, en cambio, se muestra el perfil de tiempo proporcionado por PARAFAC y el esperado, es decir, un valor siempre constante. Aunque ambos son muy similares, el perfil de tiempo proporcionado por PARAFAC muestra una disminución inicial de la fluorescencia que se estabiliza aproximadamente a partir de los primeros 2 minutos. Este hecho se observó en todas las muestras procesadas y puede deberse a la inestabilidad de la temperatura en la cubeta del espectrofluorímetro. Las disoluciones, que se encuentran a temperatura ambiente, tardan unos minutos en alcanzar la temperatura de 40 °C a la que se encuentra la celda de medida del

espectrofluorímetro. Puesto que la intensidad de la fluorescencia disminuye generalmente con el aumento de temperatura, la disminución inicial observada en la Figura VI.20.C, para el fondo del suero, se atribuye al aumento de temperatura que sufre la disolución hasta alcanzar los 40 °C, que fue la temperatura seleccionada para obtener mayor sensibilidad en la reacción de la hidrólisis de la PROCA.

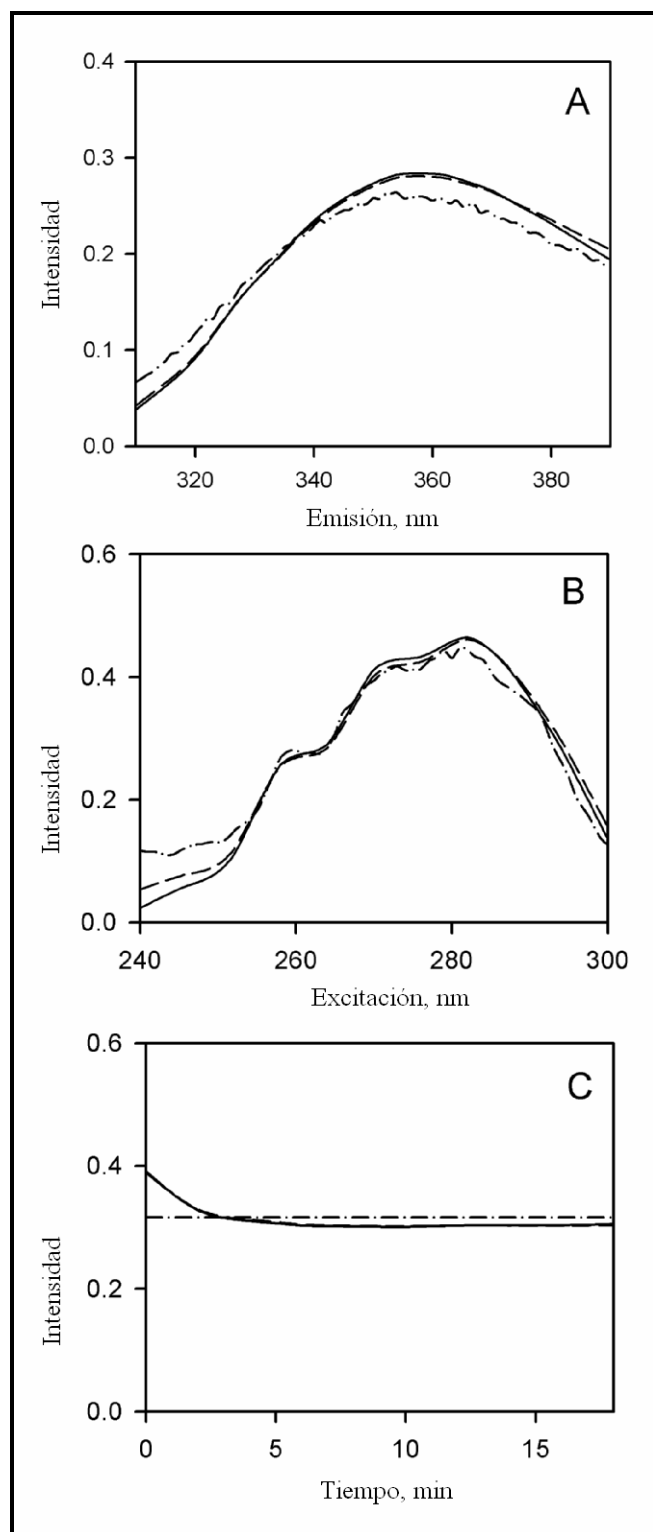


Figura VI.20. Perfiles espectrales obtenidos con PARAFAC (—) y N-PLS/RTL (- - -) al procesar una muestra de suero equino. También se representan los espectros de una muestra de suero sin procesar (- · - · -). A) Perfiles de emisión. B) Perfiles de excitación. C) Perfiles de tiempo. Todos los perfiles están normalizados a la unidad.

Al igual que se hizo con los datos obtenidos del conjunto de validación, para predecir las concentraciones de ambos analitos en las muestras de suero contaminadas, fue necesario realizar un paso de calibración mediante MLR, relacionando las columnas relevantes de **A** (es decir, las columnas que corresponden a los analitos) con las concentraciones nominales de la calibración, debido a la dependencia lineal que ocurre entre los scores de los analitos.

Los resultados obtenidos al predecir las concentraciones de PROCA, demostraron que había un grado constante de pérdida de ésta durante el procedimiento del desproteinización. El conjunto de muestras de suero contaminadas (T2) con diversas concentraciones de ambos analitos, presentó una buena correlación entre los valores predichos y los valores nominales en el caso de PABA. Pero en el caso de PROCA, esta correlación lineal presentó una pendiente inferior al valor ideal 1.

Cuando se representaron los valores predichos frente a los valores nominales de PROCA, obtenidos para el conjunto de muestras T1, se obtuvo una recta de pendiente  $0.47 \pm 0.02$  y coeficiente de correlación,  $R^2$ , 0.9819. Este valor para la pendiente se empleó para corregir las pérdidas de PROCA en el proceso de desproteneización, cuando se realizaron las predicciones al conjunto de muestras T2.

Como se indica en la bibliografía [39], el grado de unión de PROCA a las proteínas presentes en el suero es, aproximadamente, del 45 %. Por ello, hemos atribuido el bajo valor de la pendiente, en el caso de PROCA, a este fenómeno.

Al aplicar PARAFAC para predecir el conjunto de muestras de suero T2, empleando el valor de la pendiente obtenido para el conjunto de muestras T1, para corregir las predicciones obtenidas para PROCA, se obtuvieron los resultados que se muestran en la Tabla VI.5. Se puede decir, que los valores de RMSEP y REP% son razonables, teniendo en cuenta la complejidad de las muestras biológicas estudiadas.

Tabla VI.5. Resultados obtenidos al analizar el conjunto de muestras de suero T2 con los diferentes algoritmos.

<b>PROCAÍNA</b>				
Nominal (ng mL <sup>-1</sup> )	PARAFAC	Predicha <sup>c</sup> (ng mL <sup>-1</sup> )		U-PLS
		N-PLS	TLLS	
0	57	38	-35	-20
0	0	-38	-88	20
540	651	614	529	580
747	919	834	759	1003
567	612	580	494	700
<b>RMSEP<sup>a</sup> (ng mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>97</b>	<b>55</b>	<b>54</b>	<b>109</b>
<b>REP<sup>b</sup>, %</b>	<b>22</b>	<b>12</b>	<b>12</b>	<b>24</b>
<b>ÁCIDO p-AMINO BENZOICO</b>				
Nominal (ng mL <sup>-1</sup> )	PARAFAC	Predicha (ng mL <sup>-1</sup> )		U-PLS
		N-PLS	TLLS	
300	320	297	320	297
0	70	54	70	55
110	170	147	150	149
250	310	317	325	310
400	445	416	445	405
<b>RMSEP<sup>a</sup> (ng mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>54</b>	<b>42</b>	<b>54</b>	<b>40</b>
<b>REP<sup>b</sup>, %</b>	<b>18</b>	<b>14</b>	<b>18</b>	<b>13</b>

<sup>a</sup>RMSEP = raíz cuadrada de la media de los errores de predicción al cuadrado.

<sup>b</sup>REP% = error relativo de predicción.

<sup>c</sup>Valores de predicción corregidos con el factor de corrección para la desprotoneización.

➤ ***Aplicación de N-PLS***

En las Figuras VI.20.A y VI.20.B, se observa que PARAFAC proporciona correctamente los perfiles espectrales (excitación y emisión) de una muestra de suero sin contaminar, ya que coinciden con los obtenidos al registrar dicha muestra.

El uso de la metodología N-PLS/RTL a este sistema proporciona correctamente los perfiles espectrales y de tiempo para una muestra de suero sin contaminar, ya que coinciden con los obtenidos al registrar dicha muestra. En la Figura VI.20.A, VI.20.B y VI.20.C se observa cómo el procedimiento RTL puede recuperar los perfiles de esta muestra con una calidad comparable a la de PARAFAC, lo que implica que el procedimiento RTL es válido para obtener la ventaja segundo orden. Además, la disminución leve de la intensidad de la fluorescencia para el suero durante los primeros minutos de la reacción, también se observa en el perfil de tiempo proporcionado mediante RTL, Figura VI.20.C.

De nuevo, se estudió el conjunto de muestras de suero T1, contaminadas solamente con PROCA, para determinar la recuperación de PROCA después del proceso de desproteneización. De este estudio se obtuvo una recta de pendiente  $0.45 \pm 0.02$  y coeficiente de correlación,  $R^2$ , 0.9930. Se puede ver que los resultados son similares a los obtenidos mediante PARAFAC. Se empleó este valor de la pendiente para corregir las pérdidas de PROCA debidas al proceso de desproteneización cuando se realizaron las predicciones del conjunto de muestras T2.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla VI.5 y, podemos ver, que las predicciones obtenidas con N-PLS, así como las figuras de mérito, son mejores que las proporcionadas por PARAFAC.

➤ *Aplicación de U-PLS y TLLS*

El uso de las metodologías de desdoblamiento (unfolding) TLLS/RTL y U-PLS/RTL proporcionaron resultados similares a los obtenidos con N-PLS/RTL (Tabla VI.5).

La recuperación de PROCA en el conjunto de muestras T1 nos proporcionó los siguientes resultados: U-PLS/RTL, pendiente =  $0.45 \pm 0.02$  ( $R^2 = 0.9890$ ), y TLLS/RTL, pendiente =  $0.51 \pm 0.02$  ( $R^2 = 0.9874$ ).

La predicción del conjunto de muestras de suero T2, nos proporcionó resultados comparables a los obtenidos con N-PLS/RTL, excepto en el caso de U-PLS/RTL para PROCA (Tabla VI.5), que son comparables a los obtenidos con PARAFAC.

Finalmente, aplicamos el test de la elipse, EJCR, para comparar los valores de concentración predichos por cada método con los valores teóricos de ambos analitos.

Las elipses obtenidas se muestran en la Figura VI.21.



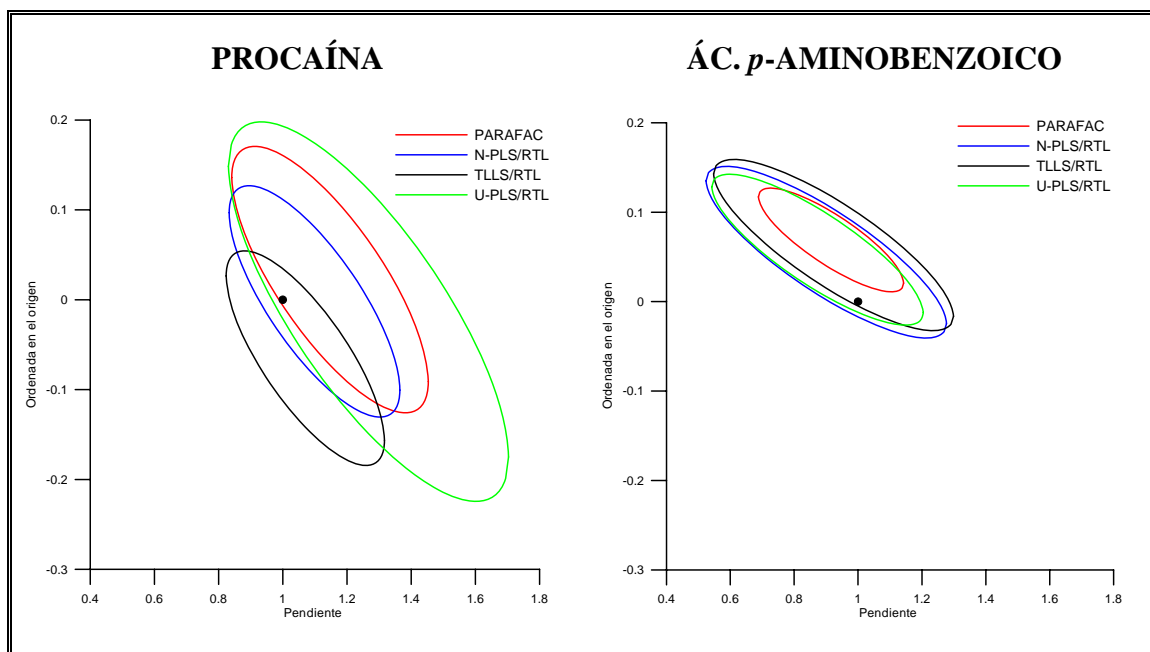


Figura VI.21. EJCR al comparar las concentraciones teóricas con las predichas por los distintos métodos para la procaína y el ácido *p*-aminobenzoico en el conjunto de muestras, T2, de suero equino.

Se puede ver como, en todos los casos, el punto teórico (1, 0) está dentro de las elipses en el caso de la PROCA, lo que indica una buena exactitud de estos métodos en su determinación, aunque del mayor tamaño de las elipses obtenidas, en comparación con PABA, podemos decir que los resultados son menos precisos para este analito. En el caso del PABA, al aplicar PARAFAC, se obtiene una elipse que no incluye el punto teórico (1,0), por lo que este método no proporcionaría resultados exactos en esta determinación. No obstante, el resto de los métodos proporcionan resultados que no difieren estadísticamente de los valores teóricos, para un nivel de confianza del 95 %, obteniendo, además, resultados más precisos que para PROCA.

## **VI.5. CONCLUSIONES**

El uso de la cinética conjuntamente con matrices de excitación-emisión fluorescentes nos permitió obtener los datos de cuatro vías empleados en este capítulo.

Para procesar este tipo de datos, hay varios algoritmos disponibles basados en el procedimiento de desdoblamiento de datos (unfolding), aunque no aprovechan la ventaja completa de la estructura de datos tercer orden. En este sentido, N-PLS es un método que, combinado con el procedimiento de trilinealización residual, obtiene la ventaja de segundo orden necesaria para cuantificar satisfactoriamente los analitos en muestras biológicas complejas.

El método que se propone en este capítulo está basado en la combinación de N-PLS y RTL. Es actualmente el único competidor disponible frente a PARAFAC para el análisis de datos reales de tercer orden que obtiene la importante ventaja segundo orden y, ha demostrado, proporcionar mejores resultados que PARAFAC en las muestras estudiadas, debido a la estructura interna más flexible que posee en comparación con PARAFAC, que hace que pueda modelar más adecuadamente los datos de cuatro vías que no son estrictamente cuatrilíneales.

## VI.6. BIBLIOGRAFÍA

---

1. Reynolds, J. E. F. (Ed.), W. Martindale, *Extra Pharmacopoeia*, XXXI, Pharmaceutical Press, London (1996) p. 76.
2. Turner, P.; Violans, G.; Wiserman, H.; *Drugs Handbook*, McMillan, London (1993) p. 76.
3. Committee for Veterinary Medicinal Products, *Procaine*. Summary Report EMEA/MRL/217/97-FINAL of the Veterinary Medicines Evaluation Unit, European Agency for the Evaluation of Medicine Products, January 1998.
4. Strichartz G.R., Berde C.B., *Anestésicos locales*. En: Miller RD, ed. *Anestesia* (4<sup>a</sup> ed). Barcelona: Ediciones Doyma (1998) I: 475.
5. Butterworth J.F., Strichartz G.R., *Anesthesiology*, 72 (1990) 711.
6. Denson D.D., Mazoit J.X., Physiology and pharmacology of local anesthetic. En: Sinatra R.S., ed. *Acute Pain*. Saint Louis: Mosby Year Book (1992) 124.
7. Covino B., Wildsmith J., Clinical Pharmacology of Local Anesthetics Agents. En: Cousins M. (ed). *Neural Blockade in clinical anesthesia and management of pain*. Philadelphia. Lippincot-Raven (1998) 97.
8. Maestre M.L., Aliaga L., *Anestésicos locales*. En: Alejandro Miranda, ed. *Tratado de Anestesiología y Reanimación en Obstetricia: Principios fundamentales y bases de aplicación práctica*. Barcelona: Masson (1997) 186.
9. Freysz M., *Anesth Réanim*, 9 (1990) 563.
10. Lee Son S., Wang G.K., Concus A., Crill E., Strichartz G., *Anesthesiology*, 77 (1992) 324.
11. [http://omega.ilce.edu.mx:3000/sites/ciencia/volumen3/ciencia3/130/html/sec\\_16.html](http://omega.ilce.edu.mx:3000/sites/ciencia/volumen3/ciencia3/130/html/sec_16.html)
12. <http://www.cfnavarra.es/salud/anales/textos/vol22/suple2/suple2.html>
13. [http://www.rehabilitacionvet.com.ar/medicina\\_biorreguladora/procaina\\_copyright\\_buffolo\\_eduardo\\_mv.htm](http://www.rehabilitacionvet.com.ar/medicina_biorreguladora/procaina_copyright_buffolo_eduardo_mv.htm)
14. <http://healthlibrary.epnet.com/GetContent.aspx?token=8482e079-8512-47c2-960c-a403c77a5e4c&chunkiid=125106#P1>
15. [http://www.colvet.es/Infovet/nov01/ciencias\\_v/articulo1.htm](http://www.colvet.es/Infovet/nov01/ciencias_v/articulo1.htm)

16. Luo, Y.; McNamara, B.; Fennell, M.A.; Teleis, D.C.; May, L.; Rudy, J.; Watson, A.O.; Uboh, C.E.; Soma, L.R., *J. Chromatogr. B*, 714 (1998) 269.
17. Storms, M. L.; Stewart, J. T. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 30 (2002) 49.
18. Berzas Nevado, J. J.; Murillo Pulgarín, J. A.; Reillo Escudero, O. I. *Appl. Spectrosc.*, 54 (2000) 1678.
19. Einosuke, T.; Yuji, N.; Xuan, Z. S.; Shogo, M.; Yukio, K.; *Jpn. J. Forensic Toxicol.*, 13 (1995) 11.
20. Badea, I.; Moja, D.; Viladescu, L. *Anal. Biochem.*, 374 (2002) 51.
21. Carretero, A. S.; Cruces-Blanco, C.; Peinado, S. F.; Bergmi, R. E. I.; Gutiérrez, A. F. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 21 (1999) 969.
22. Vianquerp, VI.; Rodriguez, C.; Coiffard, C.; Coiffard, L. J. M.; De Roeck-Holtzhauer, Y. *J. Chromatogr. A*, 832 (1999) 273.
23. Kastel, R.; Rosival, I.; Blahovec, J. *Biomed. Chromatogr.*, 8 (1994) 294.
24. Stokes, D. L.; Vlo-Dinh, T. *Sens. Actuators B*, 69 (2000) 28.
25. Chen, L. C.; Hu, M. L. *J. Food Drug Anal.*, 4 (1996) 75.
26. Yang, H.; Thyron, F. C. *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.*, 21 (1998) 1347.
27. Rop, P. P.; Grimaldi, F.; Bresson, M.; Fornaris, M.; Viala, A. *J. Liq. Chromatogr.*, 16 (1993) 2797.
28. Dhananjeyan, M. R.; Bykowski, C.; Trendel, J. A.; Sarver, J. G.; Andob, H.; Erhardt, P. W. *J. Chromatography B*, 847 (2007) 224.
29. Kondritzer A. A.; Zvirblis P. *J. Am. Pharm. Assoc.*, 46 (1957) 531.
30. Bro, R.; Kiers, H. A. L. *J. Chemometrics*, 17 (2003) 274.
31. Espinosa Mansilla, A.; Muñoz de la Peña, A.; Goicoechea, H. C.; Olivieri, A. C. *Appl. Spectrosc.*, 58 (2004) 83.
32. Marsili, N. R.; Lista, A.; Fernandez Band, B. S.; Goicoechea, H. C.; Olivieri, A. C. *J. Agric. Food. Chem.*, 52 (2004) 2479.
33. Nikolajsen, R. P. H.; Booksh, K. S.; Hansen, A. M.; Bro, R. *Anal. Chim. Acta*, 475 (2003) 137.
34. Haaland, D. M.; Thomas, E. VI. *Anal. Chem.*, 60 (1988) 1193.

- 
35. Escandar G. M., Faber N. M., Goicochea H. C., Muñoz de la Peña A., Olivieri A.C., Poppi R.J., *Trends in Analytical Chemistry*, En Prensa.
  36. Longo A. E., *Control de calidad aplicado a laboratorios químico-clínicos*. Gráficas Atlas Impresiones Rosario, Santa Fe, Argentina (1982) p. 306.
  37. Luo Y., McNamara B., Fennell M. A., Teleis D. C., May L., Rudy J., Watson A. O., Uboh C. E., Soma L. R., *J. Chromatogr. B*, 714 (1998) 269.
  38. Muñoz de la Peña A., Espinosa Mansilla A., González Gómez D., Olivieri A. C., Goicochea H. C., *Anal. Chem.*, 75 (2003) 2640.
  39. Tobin, T.; Blake, J. W. *Brit. J. Sport Med.*, 10 (1976) 109.



**TRABAJOS PUBLICADOS Y ENVIADOS**





La presente Memoria de Investigación ha dado lugar a los siguientes trabajos:

1. Stopped -flow and kinetic-fluorimetric determination of quinalphos in water samples, I. Duran Merás, A. Muñoz de la Peña, M. I. Acedo Valenzuela, A. Jiménez Girón, *Talanta*, 69 (2006) 397-402.
2. Resolution of ofloxacin-ciprofloxacin and ofloxacin-norfloxacin binary mixtures by flow-injection chemiluminescence in combination with partial least squares multivariate calibration, J. A. Murillo, A. Alañón Molina, A. Muñoz de la Peña, I. Durán Merás, A. Jiménez Girón, *Journal of Fluorescence*, (2007) Aceptado.
3. Four-way calibration applied to the simultaneous determination of folic acid and methotrexate in urine samples, A. Muñoz de la Peña, I. Durán Merás, A. Jiménez Girón, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 385 (2006) 1289-1297.
4. Evaluation of unfolded-partial least-squares coupled to residual trilinearization for four-way calibration of folic acid and methotrexate in human serum samples, A. Muñoz de la Peña, I. Durán Merás, A. Jiménez Girón and H. C. Goicoechea, *Talanta* (2007) doi: 10.1016/j.talanta.2007.01.018.
5. Multi-way partial least-squares coupled to residual trilinearization: a genuine multi-dimensional tool for the study of third-order data. Simultaneous analysis of procaine and its metabolite *p*-amino benzoic acid in equine serum, P. C. Damiani, I. Durán Merás, A. García Reiriz, A. Jiménez Girón, A. Muñoz de la Peña, A. C. Olivieri, *Analytical Chemistry*, Enviado.





Talanta, 69 (2006) 397-402

**Stopped -flow and kinetic-fluorimetric  
determination of quinalphos in water samples**





## Stopped-flow and kinetic-fluorimetric determination of quinalphos in water samples

I. Duran Merás\*, A. Muñoz de la Peña, M.I. Acedo-Valenzuela, A. Jiménez Girón

*Department of Analytical Chemistry, University of Extremadura, 06071 Badajoz, Spain*

Received 22 February 2005; received in revised form 5 July 2005; accepted 4 August 2005

### Abstract

The hydrolysis of the pesticide quinalphos in basic medium was kinetically followed and the measurement of the reaction rates allowed us to develop two kinetic-fluorimetric methods. In one of them the mixing of the reagents was directly performed in the measurement cell and, in the another one, the stopped-flow mixing technique was used. The reaction was completed in 100 s after the reactants were mixed and it allowed the simple application of the proposed methods to routine analyses of the pesticide. The sensitivity of the methods was very high, being the detection limits 50 and 140 ng mL<sup>-1</sup> for the manual procedure and the stopped-flow mixing technique, respectively. Both methods were compared using regression with uncertainties in both axes. The effect of the presence of several pesticides in the determination was tested. A solid-phase extraction process was also developed for the application of the methods to diverse waters samples. The proposed kinetic-fluorimetric methods were applied to the determination of quinalphos in drinking water, well water and river water, with very satisfactory results.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Quinalphos; Hydrolysis; Fluorescence; Kinetic measurements

### 1. Introduction

Due to the expansion of the crops, chemical pesticides have been widely used against a great variety of plagues and serious environmental pollution problems have arisen. Thereby, much emphasis is now placed on monitoring the levels and effects of pesticides in air, water and food supplies.

Quinalphos (*O,O*-diethyl-*O*-quinoxalin-2-yl-phosphorothioate) is an important organophosphorus pesticide which is used against a great variety of plagues in cotton, vegetables, fruits, etc. This insecticide acts by ingestion and contact and it is characterized by its penetrating action, being its persistence estimated in 10–15 days.

Several methods have been proposed for determining quinalphos in fruits and vegetables, mainly chromatographic methods and, specifically, gas chromatographic methods [1–7]. They are not very suitable for quinalphos analysis because this compound is very sensitive to heat and is decom-

posing on the column, leading to inaccurate results. Other methods involve liquid chromatography [8,9]. Also, methods without previous separation steps have been developed, such as spectrophotometric [10] and spectrofluorimetric methods [11]. A gravimetric method for determining quinalphos, based on its reaction with copper(I) chloride, has been also proposed [12].

Spectrofluorimetry offers excellent detection limits in the determination of trace amounts of many organic molecules. In this paper, two kinetic-fluorimetric methods have been developed for quinalphos quantification, based on the hydrolysis of this pesticide in alkaline medium. To make the kinetic measurements, the stopped-flow mixing reactor and the manual mixture of the reagents in the cell have been used. In both cases, the reaction rates have been obtained by using two different methods. Finally, a previous process of extraction has been optimized in solid-phase, with the object of determining quinalphos in diverse water samples. These procedures have been satisfactorily applied to the determination of the pesticide in drinking water, well water and in water of the Guadiana River to its passage through the city of Badajoz (Spain).

\* Corresponding author. Fax: +34 924 289375.  
E-mail address: [iduran@unex.es](mailto:iduran@unex.es) (I.D. Merás).

## 2. Experimental

### 2.1. Reagents

All experiments were performed with analytical reagent grade chemicals. Ethanolic standard solutions of  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  of quinalphos (purity 99.5%, Dr. Ehrenstorfer GmbH) were prepared and stored in the dark at  $4^\circ\text{C}$ . Solutions of lower concentrations were prepared by appropriate dilution of the stock solution with ethanol. Sodium hydroxide (Panreac) solutions were prepared by dilution in ultra pure grade water. Sep-Pak Plus C18 Cartridges (360 mg) (Waters) were also used.

### 2.2. Apparatus and software

The acquisition of kinetic data and the fluorescent measurements were made on a SLM Aminco Bowman, Series 2 luminescence instrument, equipped with a 150 W continuous Xenon lamp, interfaced by a GPIB card and driver with a PC Pentium II microcomputer. Data acquisition was performed by the use of AB2 Software Version 1.40, running under Windows 98.

The instrument incorporates a MilliFlow stopped-flow reactor, allowing the study of changes in luminescence reactions, when two reactants are vigorously forced through the mixing chamber and suddenly stopped in the observation cell. The MilliFlow consists of two fill syringes, two drive syringes, an observation cell (path length of 2 mm), a stop syringe, a stop block, and an exhaust and fill valve levers. Hamilton gasting syringes of 2.5 mL (drive syringes) were used to hold the two reactant solutions. The syringes are made from controlled, inner-diameter borosilicate glass with precision machined teflon plunger tips (these pistons are simultaneously driven by air-operated plungers). Thermostatic equipment permits a constant temperature between 10 and  $45^\circ\text{C}$  in the stopped-flow module and in the cell compartment, by circulating water from a Selecta Unitronic 320 OR thermostatic bath.

The kinetic curve processing was performed by means of the ESCIN program, developed by us, in Mat Lab code, which allows the linear region optimization in the kinetic curve, and fit by means of least squares regression to obtain the maximum rate of the reaction. The statistical analysis was performed by means of the ACOC program, developed by us, in Mat Lab code [13].

### 2.3. Procedures for the kinetic-fluorimetric determination of quinalphos

#### 2.3.1. Manual procedure

An aliquot of the quinalphos in water:ethanol (95:5, v:v) stock solution or sample was transferred to the cell, for a final concentration between  $0.067$  and  $1.2 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Then ethanol, if necessary, to complete 5%, deionized water to complete 2.0 and 1.0 mL of 4.5 M NaOH solution were added.

The evolution of the fluorescence emission intensity with time at 418 nm ( $\lambda_{\text{ex}} = 353$  nm,  $\text{bandpass}_{\text{ex/em}}(\text{nm/nm}) = 4/8$ ) was scanned during 70 s, with a resolution of 1 s, and maintaining the temperature at  $60^\circ\text{C}$ . The reaction rate was measured as the tangent in the linear part of the kinetic curve obtained by linear regression of 50 experimental points, using a fixed-time interval between 10 and 60 s, or a variable-time interval ( $\Delta t = 50$  s). The variable-time interval giving the maximum rate was selected. Each sample was assayed in triplicate.

#### 2.3.2. Stopped-flow procedure

One-drive syringe was filled with a solution containing a standard or sample solution of quinalphos in water:ethanol (95:5, v:v) at a final concentration between 0.12 and  $5.8 \mu\text{g mL}^{-1}$ . The other syringe was filled with a solution of NaOH 3 M. Then, the two solutions were mixed in the mixing chamber in each run. The variation of the fluorescence emission intensity with the time was monitored at 418 nm ( $\lambda_{\text{ex}} = 353$  nm,  $\text{bandpass}_{\text{ex/em}}(\text{nm/nm}) = 8/16$ ), at  $25^\circ\text{C}$  and for 30 s, with a resolution of 1 s. The reaction rate was determined at a fixed-time interval between 10 and 20 s, or at a variable interval time ( $\Delta t = 10$  s). The variable-time interval giving the maximum rate was selected. The samples were prepared in triplicate and, of each one of them, three injections were made.

#### 2.3.3. Determination of quinalphos in water samples

For the determination, 50 mL of sample (river water, drinking water or well water) were passed through a C18 cartridge, previously conditioned with 10 mL of methanol and 10 mL of deionized water. For the elution, 5 mL of diethyl ether were passed through the cartridge. The eluate was evaporated to dryness and the residue was dissolved in 10 mL of ethanol:water (5:95, v:v). The samples were prepared in triplicate and, of each one of them, three injections were made.

## 3. Results and discussion

The reaction rates were obtained by using two different methods. In the first method, the fluorescence data in a fixed-time interval was used, selected by application of the least squares method and, in the second case, a variable-time method for selecting the most favourable reaction rate, was applied. In both cases, the ESCIN program was used.

For the manual procedure, the most favourable statistical parameters were obtained in the fixed-time interval between 10 and 60 s and, when the variable-time method was used, an interval of 50 s was selected.

For the stopped-flow procedure, the most favourable statistical parameters were obtained in the range between 10 and 20 s, in order to calculate the reaction rate in a fixed-time interval. To calculate the greatest reaction rate, a time interval of 10 s was selected.

All the reported concentrations, for the stopped-flow procedure are the initial concentrations in the syringes (twice the actual concentrations in the reaction mixture, at time zero after mixing). Each of the kinetic results was the average of three measurements.

### 3.1. Kinetic-fluorimetric study of quinalphos

Quinalphos is a weakly fluorescent compound, but the hydrolysis of this pesticide in alkaline medium generates quinoxalin-2-ol, which is strongly fluorescent and, by means of the measurement of the reaction rate, two kinetic-fluorimetric methods have been developed for its quantification. Fig. 1 shows the excitation and emission spectra of quinalphos and its hydrolysis product in ethanol/water medium.

The intensity of fluorescence increases when decreases the percentage of ethanol in the medium and, in addition, slight displacements in the maxima of excitation and emission take place. When a 5% (v/v) ethanol/water solution of quinalphos was treated with 1.5 M NaOH, the excitation spectrum of quinoxalin-2-ol shows a maximum located at 353 nm, and the emission spectrum shows a maximum at 418 nm. These were the selected wavelengths to carry out the measurement of the evolution of the fluorescence emission with time.

The influence of the ethanol percentage was studied in the range between 5 and 50% (2.5 and 25% for the stopped-flow procedure, due to dilution in the cell of measurement). It was found that the reaction rate remains practically constant until a value of 15%, and decreases for higher ethanol percentage (−1 partial order). An ethanol percentage of 5% for the manual procedure and for the stopped-flow procedure was selected as optimum.

The effect of the temperature on the reaction rate was examined between 10 and 70 °C, for the manual procedure, and between 10 and 45 °C, for the stopped-flow procedure.

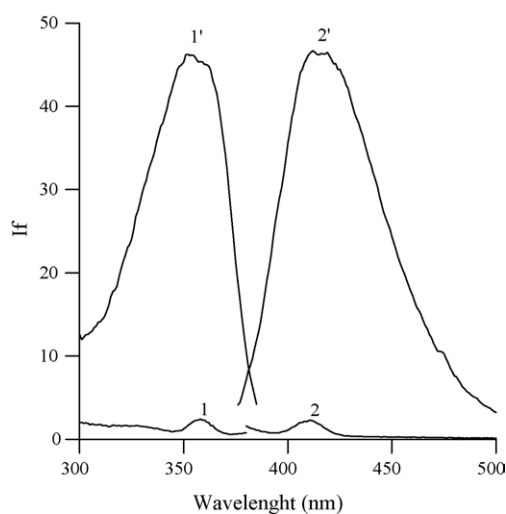


Fig. 1. Excitation and emission spectra of quinalphos (1, 2) and its hydrolysis product (1', 2') in ethanol:water (5:95, v/v) [quinalphos] = 1 µg mL<sup>-1</sup>.

In both methods, the rate of the reaction is strongly favoured, and it increases exponentially with the temperature. A temperature of 60 °C was selected for the manual procedure and 25 °C for the stopped-flow procedure, as in this case, higher temperatures are not advisable, because of the serious inconvenience of formation of bubbles.

The study of the influence of NaOH concentration in the manual method, shows that the reaction rate first increased with NaOH concentration until reaching a constant value. In Fig. 2, the variation of the rate of reaction with the concentration of NaOH, is represented. For [NaOH] < 1.3 M, the rate of reaction increased when the concentration increased (1/2 partial order). For higher concentrations, the reaction rate remains about constant. A 1.5 M (within the constant range) concentration of NaOH was selected as optimum to obtain the highest sensitivity.

The study of the influence of NaOH concentration, on the stopped-flow procedure at 25 °C, shows that the reaction rate increased with NaOH concentration in all the range assayed between 0 and 3 M. For higher temperature values (40 °C), the reaction rate was independent of the NaOH concentration for values greater than 2 M NaOH. We have to take into account that a temperature of 25 °C has been selected as, for temperatures higher than 25 °C, the analytical signal is not reproducible due to the instrumental noise and to the formation of bubbles. More concentrated NaOH solutions could attack some components of the stopped-flow reactor. In addition, processes of decomposition of our product could be produced. In consequence, a concentration of NaOH 3 M has been selected.

A plot of the logarithm of the reaction rate, against the inverse of the absolute temperature, allows us to calculate a value of the activation energy of 20 KJ mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>.

For the manual procedure, the influence of the addition order was studied and no differences were found.

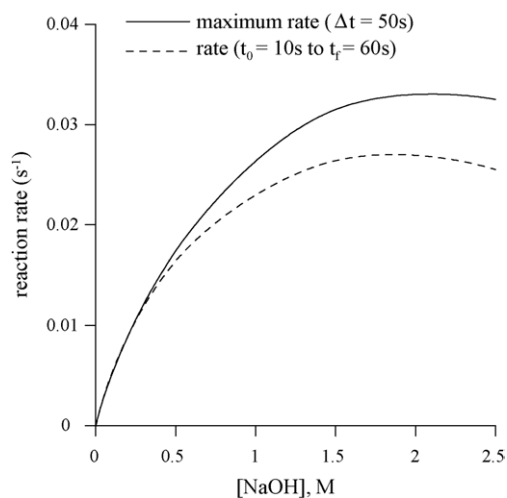


Fig. 2. Influence of NaOH concentration in the reaction rate, for the manual procedure. [Quinalphos] = 1 µg mL<sup>-1</sup>, maximum rate measured (Δt = 50 s), rate measured between t<sub>0</sub> = 10 s and t<sub>f</sub> = 60 s.

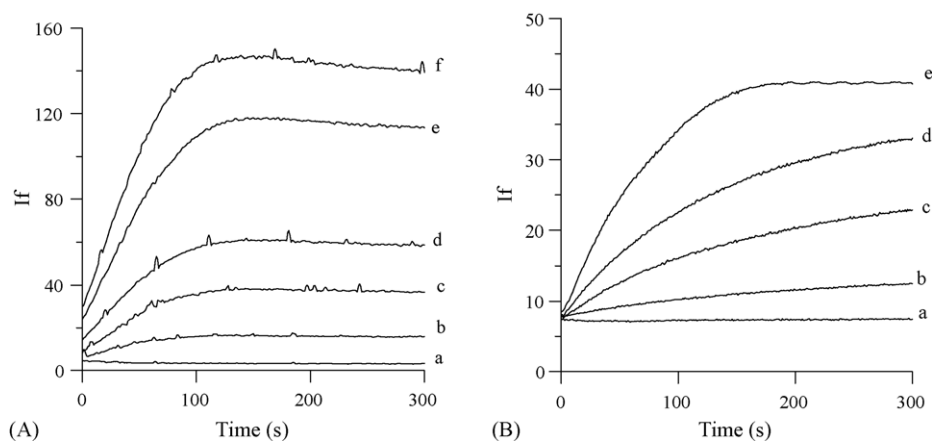


Fig. 3. Kinetic curves recorded for samples containing several concentrations of quinalphos (A) between 0.05 and 1.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , by the manual procedure (a, 0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; b, 0.067  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; c, 0.17  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; d, 0.26  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; e, 0.50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; f, 0.67  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) and (B) between 0.12 and 3.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , by the stopped-flow procedure (a, 0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; b, 0.12  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; c, 0.35  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; d, 0.60  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; e, 1.16  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).

### 3.2. Calibration curves and analytical parameters

Under the optimum physico-chemical selected conditions, the fluorescence-time signals at 418 nm ( $\lambda_{\text{ex}} = 353 \text{ nm}$ ) were recorded between 0 and 300 s, for solutions containing different amounts of quinalphos by the manual technique and by the stopped-flow technique, Fig. 3. The reaction rate values were calculated at fixed-time intervals, between 10 and 60 s, and between 10 and 20 s, for the manual and the stopped-flow techniques, respectively. When a variable-time interval method was used to calculate the reaction rate values, intervals of 50 and 10 s were selected, for the manual and the stopped-flow techniques, respectively. In Table 1, the analytical and statistical parameters of the determination procedures, are summarized. As can be observed, the sensitivity of the manual procedure is better than the stopped-flow method, as in the manual method we can work at higher temperature (60 °C) than in the stopped-flow method, in which, due to the instrumental and chemistry characteristics, we cannot work at temperatures higher than 25 °C.

Under the optimum working conditions, the initial slope of the kinetic curves were consistent with a first-order dependence on the quinalphos. The simplified kinetic equation can be expressed as:

$$d[\text{quinalphos}]/dt = k[\text{quinalphos}], \quad \text{for } [\text{NaOH}] > 1.3 \text{ M} \\ \text{and } [\text{EtOH}] < 15\%$$

The time of measure per sample is 70 s for the manual method and 30 s for the stopped-flow method.

### 3.3. Influence of foreign species

To evaluate the selectivity of the method, the effect of some other pesticides in the determination of quinalphos was studied. These pesticides (methyl parathion, ethyl parathion, fenitrothion, chlorpyrifos, methidathion and simazine) appear together with quinalphos in citrus fruits, grapes and commercial formulations. As quinalphos, these pesticides are hydrolyzed under suitable conditions of pH and temperature.

Table 1  
Analytical and statistical parameters for the kinetic-fluorimetric determination of quinalphos

	Manual procedure		Stopped-flow procedure	
	Fixed-time interval (10–60 s)	Variable-time interval ( $\Delta t = 50 \text{ s}$ )	Fixed-time interval (10–20 s)	Variable-time interval ( $\Delta t = 10 \text{ s}$ )
Linear range ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	0.050–1.0	0.050–1.2	0.12–3.5	0.12–5.8
Slope	$2.02 \pm 0.03$	$2.07 \pm 0.02$	$0.359 \pm 0.006$	$0.394 \pm 0.004$
Intercept	$-0.002 \pm 0.01$	$0.03 \pm 0.01$	$-0.01 \pm 0.009$	$-0.02 \pm 0.01$
Correlation coefficient	0.999	0.999	0.999	0.999
Relative S.D. (%), $n = 10$	5.5 (0.87 $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	6.7 (0.87 $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	0.8 (1.30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	1.0 (1.30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
LOD ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) <sup>a</sup>	0.05	0.05	0.14	0.20
LOD ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) <sup>b</sup>	0.02	0.02	0.06	0.08
Analytical sensitivity <sup>c</sup>	0.02	0.02	0.06	0.09

<sup>a</sup> Clayton et al. ( $\alpha = \beta = 0.05$ ) [14].

<sup>b</sup> Long and Winefordner ( $k = 3$ ) [15].

<sup>c</sup> Cuadros Rodríguez et al. [16].



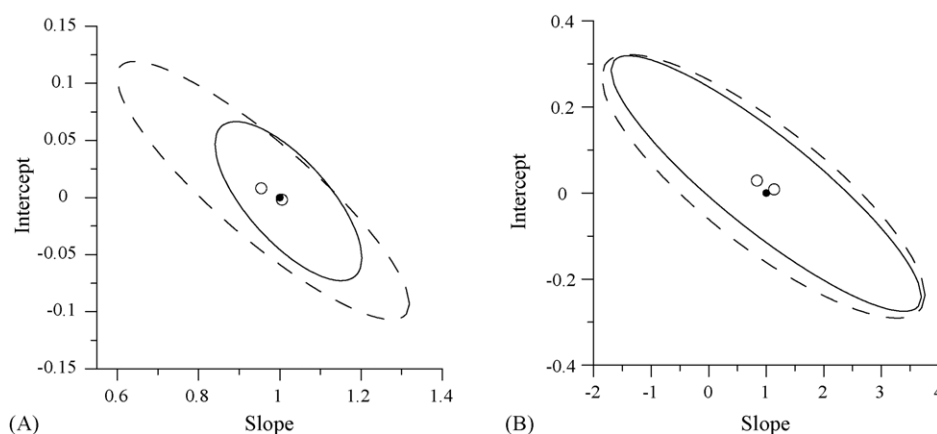


Fig. 4. Joint confidence intervals based on BLS to compare the abilities of the proposed methods. Empty points indicate the calculate point of intercept and slope while the solid ones indicate the theoretical point of zero intercept and unity slope. (A) Comparison of the predictions obtained using the maximum rate at variable-time interval and the reaction rate in a fixed-time interval: for the stopped-flow technique and for the manual procedure. (B) Comparison of the predictions obtained using the stopped-flow and the manual procedure: using the maximum rate at variable-time interval and using a fixed-time interval.

These were tested in proportions regarding the quinalphos (w/w) between 1:1 and 100:1. The same results were obtained for the manual procedure and the stopped-flow technique, calculating the slopes by means of both ways already described for each method. Methidathion and simazine are tolerated at least in a 100-fold excess (w/w) and the others are tolerated at least in five-fold excess.

### 3.4. Method comparison

These two analytical methods (the manual procedure and the stopped-flow technique) were compared by application of a linear model based on the bivariate least squares (BLS) calibration method, and taking into account the comparable errors in both axes. The results should fit a straight line where the intercept is not significantly different from zero and the slope not significantly different from one. To check these premises, the joint confidence interval for the intercept and the slope was applied [17,18]. Fig. 4 shows the joint confidence intervals for the intercept and the slope for the two methods, which is elliptical in shape. The level of significance chosen was  $\alpha = 0.05$ . It can be seen that, in all cases, the theoretical point (1, 0) is within the joint interval of the ellipse, which is indicative that these methods give comparable results.

### 3.5. Determination of quinalphos in water samples

Previous to the determination of this analyte in different water samples, a solid–liquid extraction procedure has been optimized. A Sep-Pak Plus C18 (360 mg) cartridge was used and it was conditioned with 10 mL of methanol and with 10 mL of ultrapure water at an speed of  $1.5 \text{ mL min}^{-1}$ . Single solvents (such as ethanol, diethyl ether and dichloromethane) and mixtures of two solvents (different proportions of water:ethanol and ethanol:ether) were assayed for the elution step. The results in Table 2 show that diethyl

Table 2

Effect of the solvent, at the elution stage, in the solid-phase extraction of quinalphos,  $[\text{quinalphos}] = 1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$

Solvent	Recovery (%)
Water:ethanol (70:30, v:v)	7
Water:ethanol (30:70, v:v)	36
Ethanol	64
Ethanol:diethyl ether (70:30, v:v)	66
Ethanol:diethyl ether (30:70, v:v)	76
Ethanol:diethyl ether (20:80, v:v)	77
Diethyl ether	85
Dichloromethane	71

ether is more effective than either dichloromethane or different proportions of ethanol:ether. Other variable that has been studied is the influence of ethanol percentage in the sample. In this case, 10 mL of quinalphos solutions, with ethanol percentages between 5 and 75%, were passed through the cartridge, previously conditioned, and the fractions were analyzed. The percentage recoveries show that, when the percentage was smaller than 30%, the analyte was totally retained and the retention decreased when the percentage of ethanol in the sample increased. The influence of the pH of the sample was studied between 2.5 and 7.5, and the retention of the quinalphos was not affected in this interval.

The extraction procedure optimized, summarized in Section 2.3.3, has been applied to the determination of quinalphos in water samples. A portion of 50.0 mL of water sample containing between  $0.042$  and  $0.66 \mu\text{g mL}^{-1}$  of quinalphos, was passed through the cartridge and eluted with 5 mL of diethyl ether. The eluate was evaporated until dryness and the residue was dissolved in 10.0 mL of water:ethanol (95:5, v:v). When the manual procedure was applied, an aliquot of 2.0 mL was transferred to the cell and the proposed method was applied. When the stopped-flow procedure was applied, one of the syringe was filled with the solution and the proposed method is applied. The obtained results by the first method, in the analysis of samples of drinking water,

Table 3  
Results obtained by application of the kinetic-fluorimetric method, manual procedure, in water samples

Sample	Quinalphos added ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Recovery (%) <sup>a</sup> $\pm$ RSD	
		Fixed-time interval	Variable-time interval
Drinking water	0.04	80 $\pm$ 5	95 $\pm$ 5
	0.10	93 $\pm$ 5	96 $\pm$ 2
	0.22	87 $\pm$ 2	87 $\pm$ 1
Well water	0.04	98 $\pm$ 1	110 $\pm$ 10
	0.10	82 $\pm$ 5	87 $\pm$ 4
	0.22	80 $\pm$ 5	83 $\pm$ 1
River water	0.04	94 $\pm$ 6	102 $\pm$ 7
	0.10	80 $\pm$ 6	83 $\pm$ 4
	0.22	90 $\pm$ 6	88 $\pm$ 6

<sup>a</sup> Mean of three determinations.

well water and in water of the Guadiana River, that were polluted with known concentrations of quinalphos, are shown in Table 3, where it is observed that the recoveries are quite acceptable. Similar results were obtained by the stopped-flow procedure.

#### 4. Conclusions

The hydrolysis of the pesticide quinalphos in basic medium was studied by kinetic procedures, scanning the evolution of the fluorescence signal with the time, mixing manually the reagents in the cell, and using a pneumatic stopped-flow module. The form of measuring the reaction rates, using a fixed-time interval or a variable-time interval does not considerably influence the results. The detection limit is better in the manual method but the precision of measurements is strongly improved by using the pneumatic stopped-flow module. A solid-phase extraction was optimized for the determination of quinalphos in water samples, and satisfactory results were obtained in the determination of

the pesticide, at  $\mu\text{g mL}^{-1}$  levels, in diverse water samples, obtaining recoveries between 80 and 110% in all the cases.

#### Acknowledgements

Financial support from the Junta de Extremadura, Consejería de Educación, Ciencia y Tecnología and co-financed by FEDER (Project 2PR03A073) is acknowledged.

#### References

- [1] A.L. Simplicio, L. Vilas Boas, *J. Chromatogr. A* 833 (1999) 35.
- [2] J. Oliva, A. Barba, N. Vela, F. Melendreras, S. Navarro, *J. Chromatogr. A* 882 (2000) 213.
- [3] E. Lacassie, M.F. Dreyfuss, J.M. Gaulier, P. Marquet, J.L. Daguat, G.J. Lachatre, *J. Chromatogr. B: Biomed. Appl.* 759 (2001) 109.
- [4] E. Lacassie, P. Marquet, J.M. Gaulier, M.F. Dreyfuss, G. Lachatre, *Foren. Sci. Int.* 121 (2001) 116.
- [5] M. Fernandez, C. Padron, L. Marconi, S. Ghini, R. Colombo, A.G. Sabatini, S. Girotti, *J. Chromatogr. A* 922 (2001) 257.
- [6] S. Rossi, A.P. Dalpero, S. Ghini, R. Colombo, A.G. Sabatini, S. Girotti, *J. Chromatogr. A* 905 (2001) 223.
- [7] J. Dallüge, M. Van Rijn, J. Beens, R.J.J. Vreus, U.A.T. Brinkman, *J. Chromatogr. A* 965 (2002) 207.
- [8] S. Husain, S.N. Alvi, R.N. Rao, *J. Chromatogr.* 502 (1990) 208.
- [9] F. Hernandez, J.V. Sancho, O. Pozo, A. Lara, E. Pitarch, *J. Chromatogr. A* 939 (2001) 1.
- [10] J. Raju, V.K. Gupta, *J. Microchem.* 39 (1989) 166.
- [11] F. García Sanchez, M. Hernandez Lopez, A. García Pareja, *Anal. Chim. Acta* 255 (1991) 311.
- [12] R.C. Rastogi, N.C. Dey, P. Buruah, *Analyst* 109 (1984) 1361.
- [13] A. Espinosa Mansilla, A. Muñoz de la Peña, D. González Gómez, *Chem. Educ.* 10 (2005) 9.
- [14] C.A. Clayton, J.W. Wines, P.D. Elkins, *Anal. Chem.* 59 (1987) 2506.
- [15] G.L. Long, J.D. Winefordner, *Anal. Chem.* 55 (1983) 712.
- [16] L. Cuadros Rodríguez, A.M. García Campaña, C. Jiménez Linares, M. Román Ceba, *Anal. Lett.* 26 (1993) 1243.
- [17] J. Riu, F.X. Rius, *Trend Anal. Chem.* 16 (1997) 211.
- [18] F.J. del Río, J. Riu, F.X. Rius, *Anal. Chim. Acta* 446 (2001) 49.



Journal of fluorescence, (2007) Aceptado

**Resolution of ofloxacin-ciprofloxacin and  
ofloxacin-norfloxacin binary mixtures by  
flow-injection chemiluminescence in combination  
with partial least squares**



# RESOLUTION OF OFLOXACIN-CIPROFLOXACIN AND OFLOXACIN-NORFLOXACIN BINARY MIXTURES BY FLOW-INJECTION CHEMILUMINESCENCE IN COMBINATION WITH PARTIAL LEAST SQUARES MULTIVARIATE CALIBRATION

J. A. Murillo<sup>a</sup>, A. Alañón Molina<sup>a</sup>, A. Muñoz de la Peña<sup>b</sup>, I. Durán Merás<sup>b,\*</sup> and A. Jiménez Girón<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Department of Analytical Chemistry and Foods Technology, University of Castilla-La Mancha, 13071, Ciudad Real, Spain.

<sup>b</sup> Department of Analytical Chemistry, University of Extremadura, 06071, Badajoz, Spain.

## Abstract

A flow-injection chemiluminescence (CL) method is described for the determination of Ciprofloxacin (CIP), Norfloxacin (NOR) and Ofloxacin (OFL), commonly used antibiotics of the fluoroquinolones family. The method is based on the CL reaction of the fluoroquinolones with tris(2,2'-bipyridyl) ruthenium(II) and Ce (IV), in sulphuric acid medium. The maximum CL emission, given at 0.45 min for CIP, at 0.35 min for NOR and at 0.04 min for OFL, respectively, were measured, allowing the simple application of the proposed method to the routine analysis of the antibiotics. The methods were applied to the determination of CIP, NOR and OFL, in several pharmaceutical preparations, with very satisfactory results, and validated by a previously reported HPLC method. The time-resolved equipment allowed the measurement of the kinetic evolution of the chemiluminescence signals. In base to the differences in the kinetic behaviour of ofloxacin with respect to ciprofloxacin and norfloxacin, binary mixtures of the drugs were resolved by using the time-resolved chemiluminescence signals, in combination with first-order partial least-squares (PLS) multivariate calibration.

**Keywords:** Ciprofloxacin, Norfloxacin, Ofloxacin, Time-resolved chemiluminescence, Flow injection, Pharmaceutical formulations, Partial Least Squares.

\*Corresponding author: Tel.: +34 924 289375; Fax: +34 924 289375.  
E-mail address: [iduran@unex.es](mailto:iduran@unex.es)

## 1. Introduction

Fluoroquinolones are important antibacterial agents developed in the 1980s, and have many applications in veterinary and human medicine. The pharmaceuticals have a broad spectrum of activity and good oral absorption [1]. The great advantage of these drugs, in order of activity and spectral characteristics, is due to the presence of a fluorine atom in position six of the quinolonic ring. The introduction of the fluorinated quinolones represents important therapeutic advantages, because this group of antibiotics shows higher antibacterial activity than the parent compounds [2]. There is concern about the possibility of exposure to low levels of these compounds resulting in the development of resistance of human pathogens to antibiotics [3].

Ciprofloxacin (CIP) [1-cyclopropyl-6-fluoro-1,4-dihydro-4-oxo-7-(piperazinyl)-quinolone-3-carboxylic acid], Figure 1, belong to the fluoroquinolones family, which are bacteriostatic at low concentration and bactericidal at high concentrations. CIP is approved for use in the treatment of bone and joint infections, infectious diarrhea caused by *Shigella* or *Campylobacter*, lower respiratory tract infections, skin infections, and urinary tract infections. In addition, it has found off-label use as an alternative drug for the treatment of gonorrhea, salmonella, and yersinia infections [4, 5]. In general, CIP is active against susceptible gram-negative and gram-positive aerobic bacteria, so therefore it should not be used alone for mixed aerobic-anaerobic bacterial infections [5, 6].

Norfloxacin (NOR) [1-ethyl-6-fluoro-1,4-dihydro-4-oxo-7(piperazin-1-yl)quinoline-3-carboxylic acid], Figure 1, is used in a wide range of gastrointestinal, urinary and respiratory tract infections; ocular and skin infections as well as in patients with intraabdominal infections in combination with antianaerobic agents [7-9].

Ofloxacin (OFL) ( $\pm$ )9-fluoro-2,3-dihydro-3-methyl-10-(4-methyl-1-pieraziny)-7-oxo-7H-pyrido[1,2,3-de]-1,4-benzoxazine-6-carboxylic acid, Figure 1, is a synthetic fluorinated quinolone derivative having activity against both gram negative and gram positive bacteria through inhibition of their DNA gyres [10]. It is widely used in the treatment of respiratory tract and urinary tract infections [11].

There is much interest in determining fluoroquinolones for the purpose of pharmaceutical quality control and numerous techniques have been developed. Most of the analytical methods for the determination of fluoroquinolones employ HPLC. In 1998, Carlucci reported a review of the published HPLC assays that used UV or fluorescence detection [12]. Later on, other works have been reported employing UV detection [13, 14] and fluorescence detection [15-20]. Other reported methods include: spectrophotometry [21-24], fluorimetry ([25], capillary electrophoresis [26-29], and immunoassay [30].

Chemiluminescence (CL), an analytical useful chemical property, has aroused much interest for spectroscopic detection on account of its inherent sensitivity and selectivity. Liquid-phase chemiluminescence (CL) reactions have been used to determine a wide range of analytes from trace metals to pharmaceuticals (Murillo, 2004). Analytically, these reactions are attractive on the grounds of the excellent limits of detection potentially derived from the absence of source noise and scatter, the high selectivity resulting from the limited number of available CL reactions and the wide linear ranges that can be obtained. These CL reactions have been used for the sensitive and selective detection in a wide range of analytical techniques including flow injection analysis (FIA), sequential injection analysis (SIA), high performance liquid chromatography (HPLC) and capillary electrophoresis. Various sample-reagent mixing modes have been used in combination with a detector to record the chemiluminescence

signal. Thus, a stopped-flow mixing module coupled to a CL detector, was used in conjunction with formation and decay rates of the CL profiles as kinetic measurement parameters [31, 32].

Regarding the determination of fluoroquinolones by flow-injection chemiluminescence, the cerium-sulfite, alone and sensitized by  $Tb^{3+}$ , potassium permanganate-sulfite sensitized by  $Tb^{3+}$ , potassium permanganate-thiosulfate, peroxyxynitrous acid, luminol- $H_2O_2$ , tris-(1,10-phenanthroline)ruthenium(II)-Cerium (IV) and tris(2,2'-bipyridyl) ruthenium(II)-Cerium (IV) system, have been used.

The cerium-sulfite system has been proposed for the determination of CIP [33, 34], OFL [34, 35] and NOR [34] in pharmaceutical preparations. This later reaction served as the base of a molecular imprinting polymer system for NOR determination in urine samples [36]. The same system, sensitized by  $Tb^{3+}$ , allowed lowering the detection limits of the proposed methods for CIP [37] and NOR [38] in pharmaceutical preparations, extending the procedure to urine and serum samples.

The potassium permanganate-sodium sulfite, sensitized by  $Tb^{3+}$ , was also employed for OFL [39] in pharmaceutical preparations and urine, and the potassium permanganate-sodium thiosulfate, for CIP determination in pharmaceutical preparations, serum and urine [40].

The peroxyxynitrous acid system, obtained by acidified  $H_2O_2$  plus nitrite, was proposed for the determination of CIP, NOR and OFL [41] in pharmaceutical preparations and the luminol- $H_2O_2$  was employed for OFL determination [42].

The tris-(1,10-phenanthroline)ruthenium(II)-organic acids-Ce (IV) was proposed for CIP [43] and the tris(2,2'-bipyridyl) ruthenium(II) plus Cerium (IV) for CIP, OFL and NOR [44] in pharmaceutical preparations, urine and plasma, and as an HPLC detection system for OFL determination in chicken tissues [45].

Since the initial discovery of this latter chemiluminescent system [46], its utility has only been exploited for a relatively number of analytical applications. Common of these applications is the production of the reactive oxidant,  $Ru(bipy)_3^{2+}$ , followed by reduction, by an analyte species, to produce and emission of light [47].

Time-resolved chemiluminescence, based on stopped-flow chemistry, ensure rapid, efficient mixing of chemiluminescent reagent and sample, immediately before reaching the detector, and an assembly for this novel tool was described in a previous paper [48]. In this paper, a CL method has been developed for the determination of CIP, NOR and OFL in commercial formulations. The method is based on the CL reaction of these drugs with  $[Ru(bipy)_3^{2+}]$  and Ce (IV) in sulphuric acid medium. In addition, the chemiluminescence-time data pairs acquired with this system, allowed the use of the time-resolved chemiluminescence data in combination with multivariate calibration techniques, as partial-least-squares (PLS) for the resolution of binary mixtures of the fluoroquinolones. As far to our knowledge, this is the first time that time-resolved chemiluminescence data are explored for mixtures resolution by chemometric analysis, although a time-resolved chemiluminescence method for the simultaneous determination of pyruvic and tartaric acids has been described, based on the chemiluminescent reaction of  $[Ru(bipy)_3^{2+}]$  with Ce (IV). The resolution was possible in this latter case, without resorting to chemometric techniques, as the pyruvic acid system gives the highest chemiluminescence intensity at 2 s, whereas the tartaric acid system gives its most intense chemiluminescence emission at 64 s [49].

## 2. Experimental

### 2.1. Reagents

All experiments were performed with analytical-reagent grade chemicals and pure solvents. Ultra pure water was obtained from a Milli-Q system.

CIP was obtained from Fluka and NOR and OFL from Sigma. Stock standard solutions of  $100.0 \text{ mg L}^{-1}$  were prepared in  $5.0 \times 10^{-3} \text{ M}$  sulphuric acid (Panreac). Working solutions of different concentrations were prepared by dilution of the stock solutions with  $5.0 \times 10^{-3} \text{ M}$  sulphuric acid. Exposure to direct sunlight was avoided. A  $2.5 \times 10^{-2} \text{ M}$  Ce (IV) solution was prepared by dilution of ammonium Cerium (IV) sulphate 2-hydrate (Panreac) in  $4.0 \text{ M}$  sulphuric acid. A  $2.0 \times 10^{-3} \text{ M}$   $[\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}]$  solution was prepared by dilution of tris (2,2'-bipyridyl) dichloro-ruthenium (II) hexahydrate (Aldrich) in ultra pure water.

### 2.2. Apparatus and software

The flow system comprised the conventional manifold depicted in Figure 2. The reactants (fluoroquinolone sample solution, Ce (IV) and  $[\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}]$ ) were pumped through the three-line manifold by a Gilson Minipuls-3 peristaltic pump, which was computer-controlled. The pump rate was  $10.5 \text{ mL min}^{-1}$  and the reagents circulated in poly(tetrafluoroethylene) (PTFE) flow tubes (Tygon, 0.5 mm i.d., acid-resistant) for mixing in the detector cell. At an appropriate time, the flow was stopped abruptly and chemiluminescence-time data pairs were acquired using a Camspec Chemiluminescence Detector CL-2 (photosensor module Hamamatsu 45773-20 spectral response from 300 to 600 nm; spiral-type flow cell, volume  $120 \mu\text{L}$ ; Sawston, Cambridge). The detector was interfaced to a computer via an analogue/digital converter; data were acquired using the Chromatography Station for Windows CSW32 software (Data Apex Ltd., Prague, Czech Republic) and processed to obtain parameters such as emission intensity at a fixed time and maximum emission intensity, by using a home-made software developed in our laboratory (J.A. Murillo Pulgarín, University of Castilla la Mancha, Spain).

### 2.3. Procedure

The continuous-flow manifold used to implement the stopped-flow system is described in Figure 2. The sample stream was merged with another stream of  $8.0 \times 10^{-4} \text{ M}$   $[\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}]$  and the resulting stream was mixed with  $1.75 \times 10^{-3} \text{ M}$  Ce (IV) (diluted in  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0.5 \text{ M}$ ). The merging point was a planar coiled quartz flow cell located in front of the photomultiplier tube (PMT) of a flow-through Camspec chemiluminescence detector CL-2. The flow-through system was stopped for three minutes. In this way, the reaction took place in the flow-cell. The system was interfaced to a computer via an A/D converter, and the CL transient signal was continuously monitored to obtain a plot of CL intensity versus time. All measurements were made at room temperature ( $18\text{--}20 \text{ }^\circ\text{C}$ ).

Data were acquired using the Chromatography Station for Windows CSW32 software. Each solution was assayed in triplicate and the resulting maximum emission intensity and total emission area were measured. Calibration graphs were constructed by plotting the maximum emission intensities and areas against the fluoroquinolones concentrations.



Pharmaceutical samples: For the analysis of Catex<sup>®</sup> 250 (IFC, Spain) and Cunesin 250 (Recordati, Spain), a quantity of a capsule equivalent to 225 mg of the drug was weighted accurately. For the analysis of Amicrobín (Quimifar, Spain) and Esclebin<sup>®</sup> (Lab. Alacan, Spain), a quantity of a capsule equivalent to 400 mg of the drug was weighted accurately and for the analysis of Surnox 200 (Aventis, Spain) and Oflovir (Vir, Spain), a quantity of a capsule equivalent to 100 mg of the drug was weighted accurately. The drugs were transferred into a 250 mL volumetric flask and diluted to the mark with  $5 \times 10^{-3}$  M sulphuric acid, and diluted twice with  $5 \times 10^{-3}$  M sulphuric acid to obtain final concentrations of the drugs of  $15 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$  and  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  for CIP, NOR and OFL, respectively. For the Ciproxina Simple (Alcon Cusi, Spain), Chibroxin (Thea, Spain), and Exocin<sup>®</sup> 0.3 % (Allergan, Spain), 7 mL in the first case and 0.5 mL in the other two, were transferred into a 25 mL volumetric flask and diluted to the mark with  $5 \times 10^{-3}$  M sulphuric acid and proceeded as described above. The nominal content was calculated from the calibration graphs or regression equations.

#### 2.4. Validation of the proposed method

The proposed flow-injection chemiluminescence method, using the manifold depicted in Figure 2, for the determination of fluoroquinolones was validated by comparison with a method based on HPLC separation [50], with UV-Vis detection, slightly modified by us.

The chromatographic studies were performed on a Hewlett-Packard Mod 1100 LC instrument, equipped with degasser, quaternary pump, manual six-way injection valve, containing a 20  $\mu\text{L}$  loop, Diode Array spectrophotometer detector and the CHEMSTATION software package to control the instrument, data acquisition and data analysis. An analytical column Nova-Pak C18 (150 x 3.9 mm, Waters Millipore) was used. A wavelength of 280 nm was selected to monitoring the fluoroquinolones.

The mobile phase was formed by a mixture of solvent A, being a pH 3.0 aqueous formic acid/formate buffer. The buffer concentration was 100 mmol/L. Solvent B, acetonitrile and solvent C, methanol. The mobile phase composition was 75 % A, 10 % B and 15% of C.

Stock solutions containing  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  of the fluoroquinolones were prepared in methanol. Working fluoroquinolones solutions of different concentrations were prepared by dilution of the stock solution with mobile phase and each sample was injected three times. Linear calibration graphs for area and height against the fluoroquinolones concentration were obtained.

For the analysis of pharmaceutical samples, a pill or capsule was transferred to a 100 ml volumetric flask, dissolved in methanol by shaking and sonicated for 15 minutes, being the final concentration of  $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ , which was filtered through a 22  $\mu\text{m}$  nylon filter. These solutions were diluted with mobile phase to obtain a final concentration of the drug of  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ . This treatment was performed in three pills or capsules of each pharmaceutical formulation, and each sample was injected three times. Ciproxina Simple, Chibroxin and Exocin 0.3 % solutions were prepared by adding 1 ml of the pharmaceutical liquid to a 100 ml volumetric flask, and diluting to the mark with methanol, each sample was diluted with mobile phase to obtain a final concentration of  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  and filtered through a 22  $\mu\text{m}$  nylon filter and injected three times.

### 3. Results and discussion

$\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$  has proven to be a very sensitive detection system for compounds which contain a secondary or tertiary aliphatic amine [51]. The fluoroquinolones assayed contain secondary amine (CIP and NOR) or tertiary amine (OFL) since contain a piperazine moiety. Thus, Aly et al. [44] proposed a mechanism, similar to that reported previously for amine determination utilizing its electrogenerated CL reaction with  $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$  [52]. This mechanism involves the oxidation of  $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$  and the secondary or tertiary amine present on the fluoroquinolone by Ce (IV). The oxidation product of the amine undergoes deprotonation to form a radical. This reduces the  $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{3+}$  to the excited state,  $[\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}]^*$ , that subsequently emits light returning to  $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$ . This mechanism is in agreement with another reports that suggest that the use of  $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$  in CL systems produces an orange emission at 610 nm from excited state  $[\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}]^*$  that can be obtained by different reactions which imply electron transfer and regeneration of the  $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$  specie. One of these it is between the  $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{3+}$  and a reductor [53].

The CL determination of the fluoroquinolones was also studied using potassium permanganate as oxidant. In this case, the CL reaction was slower and the emission intensity smaller. When nitric acid was used to fixing the acid medium, non-reproducible signals were found.

The experimental parameters of the corresponding CL reaction were studied and optimized.

#### 3.1. Influence of sulphuric acid concentration on the CL intensity

Ce (IV) salt cannot be dissolved in water at neutral pH; the effect of sulphuric acid concentration, when preparing cerium (IV) salt, was examined to see if this acid had a significant effect on CL emission. As shown in Figure 3, the CL intensity for CIP and OFL, was maximum and constant at concentrations around 0.5 M. At higher values, the CL intensity decreases. For NOR, the intensity decreased as the sulphuric acid concentration increased. In base of this, an optimum 0.5 M sulphuric acid concentration was chosen.

#### 3.2. Influence of the Ce (IV) concentration on CL intensity

The concentration of Ce (IV) upon the CL behaviour of fluoroquinolones was examined over the range 0.5–3.1 mM in 0.5 M sulphuric acid. The results are shown in Figure 4. Maximum and constant emission intensity was obtained since 1.5 mM Ce (IV). Therefore, 1.75 mM Ce (IV) was adopted as the working solution in future experiments.

#### 3.3. Influence of the $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$ concentration on CL intensity

The study of the influence of  $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$  concentration, over the range 0.2-1.7 mM, Figure 5, shows that the maximum CL emission first increased with  $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$  concentration until a value (0.8 mM) where it is constant. A higher concentration than

1.15 mM is not recommended because the CL emission decreases. A concentration of 0.8 mM (within the maximum and constant range) was selected.

### 3.4. Influence of flow rate on CL intensity

The flow rate is an important parameter in CL detection because the time taken to transfer the excited product into the flow cell is critical for maximum collection of the emitted light [54]. Too low or too high flow rates result in a decrease or even absence of CL in the flow cell. The optimum flow rate was found to be 10.5 mL/min.

### 3.5. Analytical performance

The above-described system and optimum experimental conditions (1.75 mM Ce (IV) in H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5 M and Ru(bipy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> 0.8 mM) were used to determine the fluoroquinolones by direct measurement of the CL transient signal, using the peak height (maximum emission intensity). Linear calibration graphs for each CL signal parameter against the fluoroquinolone concentration were obtained over the range of 1.3–30 µg mL<sup>-1</sup>, 1.4–43 µg mL<sup>-1</sup> and 0.7–15 µg mL<sup>-1</sup> for CIP, NOR and OFL respectively, using 8 standards and 3 replicates per point (Table I).

### 3.6. Applications and study of interferences

To evaluate the possible analytical applications on the CL method described above, the effect of some common excipients (citrate, manitol, lactose, sucrose, glucose, starch) used in pharmaceutical preparations was studied. The procedure consists of preparing different synthetic solutions, each one containing the fluoroquinolone (15 µg mL<sup>-1</sup>, 20 µg mL<sup>-1</sup> and 7.0 µg mL<sup>-1</sup> of CIP, NOR and OFL, respectively) and one excipient, in proportion 50:1, w:w, (substance:fluoroquinolone). Later, it was measured the CL signal of these solutions using the conditions fixed and no interference was observed from these recipients (Table II).

The proposed method was satisfactorily applied to the analyses of the fluoroquinolones in the Spanish pharmaceutical products that contain these drugs in different dosage. The assay results, expressed as a percentage of the nominal contents, resulting from the average of three determinations, are summarized in Table III, where it is observed that the recoveries are all close to 100 % and the precision is satisfactory. The results were validated by an HPLC method, as described under procedure.

In order to compare the results obtained by using the two methods, lineal regression analysis of found concentration values for the two methods was applied. Regression was performed using concentration data for the three analytes simultaneously, taken from all the commercial formulations reported in Table III, as recommended in literature [55] in order to obtain better estimates of the experimental errors. The estimated intercept and slope ( $\hat{a}$  and  $\hat{b}$ , respectively) were compared with their ideal values of 0 and 1 using the elliptical joint confidence region (EJCR) test [56]. The fitted regression parameters were: slope, 0.9979; intercept, -0.1004, with the theoretical (a = 0, b = 1) point being included within the corresponding ellipse and we concluded that there was no significant difference between the results obtained by using the two methods.

### 3.7. Simultaneous determination of binary fluoroquinolones mixtures

With the aim of performing the analysis of binary mixtures of ofloxacin and ciprofloxacin and of ofloxacin and norfloxacin, a chemometric approach, based in partial least squares (PLS-1) was evaluated. The independent calibration curves for each component were used to establish the analytical range of concentration and to study the additivity of the time-resolved chemiluminescence signals of the binary mixtures of the components.

The PLS method involves a calibration step in which, the relation between bi-dimensional time-resolved chemiluminescence and analyte concentrations, is estimated from a set of reference samples (calibration set), and a prediction step in which the results of the calibration are used to estimate the component concentrations in unknown samples (prediction set).

All calculations were done using Matlab 5.3. The routine for PLS-1 follows the classical PLS algorithm and a useful Matlab graphical interface was used for easy data manipulation and graphic presentation [57]. The interface provides a simple means of loading the data matrices into the Matlab working space before running PLS-1.

#### 3.7.1. Calibration and prediction sets

A 13-samples set was built to perform the calibration process with the PLS-1 method. The calibration corresponds to a central composite design composed of a two components full-factorial design at three levels, combined with a star design. Similarly, with the aim of validating the chemometric proposed method, a prediction set of binary samples was prepared. The analyte concentrations were comprised in the calibration set range. The compositions of the calibration and prediction sets are shown in Table IV.

#### 3.7.2. Optimization of the PLS model

In the Figure 6, a representation of the time-resolved chemiluminescence signals for binary mixtures of ofloxacin plus ciprofloxacin (A), and ofloxacin plus norfloxacin (B), are shown. The differences between the time-resolved chemiluminescence profile of ofloxacin respect to ciprofloxacin or norfloxacin are evident in the representation, and the base for the binary mixture chemometric resolution procedure.

The time interval to record the chemiluminescence response was optimized for each component of the corresponding binary mixture, to obtain the maximum coefficient of correlation in the calibration step. The time windows selected for the first mixture were between 0 and 0.138 min for ofloxacin determination and between 0.138 and 1.496 min for ciprofloxacin determination, and for the second mixture were between 0 and 0.199 min for ofloxacin determination and between 0.178 and 0.597 min for norfloxacin determination, being the resolution 0.001 min.

In order to determine the correct number of loading vectors to be used for the modelling of the data, a cross-validation calculation for all samples in the calibration set was performed to calculate the PRESS (prediction residual error sum of squares) [58, 59]. An optimum number of loading vectors of two was found for all the cases.

The PLS model was applied to the data set of problem samples (prediction set of Table 4). The samples analyzed were composed by binary mixtures of variable amounts of the components randomly selected. The recovery values obtained in the analysis of the data set are summarized in Table V. The recoveries obtained are indicating a satisfactory resolution of the binary mixtures investigated.

#### 4. Conclusions

The chemiluminescent reaction between fluoroquinolones and Ce (IV) in the presence of tris(2,2'-bipyridyl) ruthenium(II), was studied using the stopped-flow technique in a continuous-flow system and a simple, rapid and highly sensitive chemiluminometric method is described for the determination of fluoroquinolones in dosage forms. Furthermore, as it has been described, no interference from common excipients in commercial preparations is observed and the results obtained were in agreement well with those given by a HPLC method, indicating that the present method has potential for the analysis of these fluoroquinolones in drugs. The method does not require sophisticated instrument and could be widely used in the routine fluoroquinolones quality control in the analysis of pharmaceutical preparations.

As far as we know, this is the first time that the time-resolved chemiluminescence signals are proposed and combined with first-order multivariate calibration methods for mixture resolution.

A satisfactory resolution capacity was obtained by the application of a first-order multivariate method in the analysis of binary mixtures of ofloxacin-ciprofloxacin and ofloxacin-norfloxacin. It has been shown that the utilization of time-resolved chemiluminescence signals is a viable way to increase the information useful and disposable for a calibration model.

In our study, the differences in the time-resolved chemiluminescence signals of the investigated binary mixtures were used to resolve the mixtures, applying partial least squares multivariate calibration. This approach opens a new possibility of improvement of chemiluminescence methods by combining with different chemometric approaches.

**Acknowledgements:** Financial support from the Ministerio de Educación y Ciencia of Spain (Project CTQ2005-02389) and Dirección General de Investigación del Ministerio de Ciencia y Tecnología and FEDER (Project BQ2003-03105) are acknowledged.

#### References

1. J.N. Delgado, (1991) *Wilson and Gisvold's Textbook of Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry* Lippincott-Raven, p. 155 Philadelphia, US.
2. L.C. Jackson., L.A. Machado and M.L. Hamilton, (1998), Principios Generales de la terapéutica antimicrobiana, *Acta Med.* **8**, 13-27.
3. *Food Chemical News*. (1996) CRC Press: Washington DC, Vol 37, p 21.
- 4.- S. Sweetman, (2002), *Martindale: The Complete Drug Reference*, Chicago, US: The Pharmaceutical Press, p. 182.
- 5.- *Drug Information*. 1995. G.K. McEvoy, ed., American Society of Health-System Pharmacists, p. 493
- 6.- Micromedex. Thomson MICROMEDEX(R). 2002. Healthcare Series, Vol. 116, DE0858.
7. O. Ballesteros, I. Toro, V. Sanz-Nebot, A. Navalón, J.L. Vílchez and J. Barbosa, (2003), Determination of fluoroquinolones in human urine by liquid chromatography coupled to pneumatically assisted electrospray ionization mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* **798**, 137-144.
8. J.L. Vílchez, O. Ballesteros, J. Taoufiki, G. Sánchez-Palencia and A. Navalón. (2001), Determination of the antibacterial norfloxacin in human urine and serum samples by solid-phase spectrofluorimetry, *Anal. Chim. Acta* **444**, 279-286.

9. N. Rahman, Y. Ahmad and S.N.Hejaz Azmi (2004), Determination of Norfloxacin by Flow-Injection Chemiluminescence. *J. Pharm. Biopharm.* **57**, 359-363.
10. K.Sato, U. Matsuura, M. Inone, T. Ueno, Y. Osada, H. Ogawa and M. Mitshuhashi, (1982), In vitro and in vivo activity of DL-8280, a new oxazine derivative, *Antimicrob. Agents Chemother.* **22**, 548-553.
11. N. Ichihara, H. Tachizawa, M. Tsumura, T. Une and K. Sato, (1984), Phase I study on DL-8280, *Chemotherapy* **32**, 118-149.
12. G. Carlucci, (1998), Analysis of fluoroquinolones in biological fluids by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* **812**, 343–367.
13. M. Kamberi, K. Tsutsumi, T. Kotegawa, K. Nakamura and K.S. Nakano, (1998), Determination of ciprofloxacin in plasma and urine by HPLC with ultraviolet detection, *Clin. Chem.* **44**, 1251–1255.
14. M.T. Maya, N.J. Goncalves, N.B. Silva and J.A. Morais, (2001), Simple high-performance liquid chromatographic assay for the determination of ciprofloxacin in human plasma with ultraviolet detection, *J. Chromatogr. B* **755**, 305–309.
15. D.H. Wright, V.K. Herman, F.N. Konstantinides and J.C. Rotschafer, (2000), Comparative Pharmacodynamics of Three Newer Fluoroquinolones versus Six Strains of Staphylococci in an In Vitro Model under Aerobic and Anaerobic Conditions, *J. Chromatogr. B* **709**, 97–104.
16. E. Cohen, R.J. Maxwell and D.J. Donoghue (1999), Automated multi-residue isolation of fluoroquinolone antimicrobials from fortified and incurred chicken liver using on-line microdialysis and high performance liquid chromatography with programmable fluorescence detection, *J. Chromatogr. B* **724**, 137–145.
17. J.C. Yorke, and P. Froc, (2000), Quantitation of nine quinolones in chicken tissues by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection, *J. Chromatogr. A* **882**, 63–77.
18. C.K. Holtzapple, S.A. Buckley and L.H. Stanker, (2001), Determination of fluoroquinolones in serum using an on-line clean-up column coupled to high-performance immunoaffinity-reversed-phase liquid chromatography, *J. Chromatogr. B* **754**, 1–9.
19. E.M. Golet, A.C. Alder, A. Hartmann, T.A. Ternes and W. Giger, (2001), Trace Determination of Fluoroquinolone Antibacterial Agents in Urban Wastewater by Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography with Fluorescence Detection, *Anal. Chem.* **73**, 3632–3638.
20. A. Zotou, and N. Miltiadou, (2002), Sensitive LC determination of ciprofloxacin in pharmaceutical preparations and biological fluids with fluorescence detection, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **28**, 559–568.
21. A.F. El Walily, S.F. Belal and R.S. Bakry (1996), Spectrophotometric and spectrofluorimetric estimation of ciprofloxacin and norfloxacin by ternary complex formation with eosin and palladium(II), *J. Pharm. Biomed. Anal.* **14**, 561–569.
22. B.S. Nagaralli, J. Seetharamappa and M.B. Melwanki, (2002), Sensitive spectrophotometric methods for the determination of amoxicillin, ciprofloxacin and piroxicam in pure and pharmaceutical formulations, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **29**, 859–864.
23. S. Mostafa, M. El-Sadek and E.A. Alla, (2002), Spectrophotometric determination of ciprofloxacin, enrofloxacin and pefloxacin through charge transfer complex formation, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **27**, 133–142.
24. M. Rizk, F. Belal, F. Ibrahim, S. Ahmed and Z.A. Sheribah (2001), Derivative spectrophotometric analysis of 4-quinolone antibacterials in formulations and spiked biological fluids by their Cu(II) complexes, *J. AOAC Int.* **84**, 368–375.

25. A. Navalon, O. Ballesteros, R. Blanc and J.L. Vilchez, (2000), Determination of ciprofloxacin in human urine and serum by solid-phase spectrofluorimetry, *Talanta* **52**, 845-852.
26. M. Hernández, M., Aguilar, F. Borrull and M. Calull, (2002), Determination of ciprofloxacin, enrofloxacin and flumequine in pig plasma samples by capillary isotachopheresis–capillary zone electrophoresis, *J. Chromatogr. B.* **772**, 163–172.
27. C. Fierens, S. Hillaert and W. Van den Bossche, (2000), The qualitative and quantitative determination of quinolones of first and second generation by capillary electrophoresis, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **22**, 763–772.
28. P. Schmitt-Kopplin, J. Burhenne, D. Freitag, M. Spiteller and A. Kettrup, (1999), Development of capillary electrophoresis methods for the analysis of fluoroquinolones and application to the study of the influence of humic substances on their photodegradation in aqueous phase, *J. Chromatogr. A* **837**, 253–265.
29. D. Barron, E. Jiménez-Lozano, J. Cano and J. Barbosa, (2001), Determination of residues of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in biological materials by capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. B* **759**, 73–79.
30. G.G. Snitkoff, D.W. Grabe, R. Holt and G.R. Bailie, (1998), Development of an immunoassay for monitoring the levels of ciprofloxacin in patient samples, *J. Immunoassay* **19**, 227–238.
31. D. González Robledo, M. Silva and D. Pérez Bendito, (1989), Performance of the stopped-flow technique in chemiluminescence spectrometry based on direct rate measurements, *Anal. Chim. Acta* **217**, 239-247.
32. D. Pérez Bendito, M. Silva and A. Gómez Hens, (1989), An automated kinetic-based determinations for routine analysis: Recent developments, *Trends Anal. Chem.* **8**, 302-308.
33. Y.D. Liang, J.Z. Li and Z.J. Zhang, (1997), Flow-injection chemiluminescence. Determination of ciprofloxacin hydrochloride, *Fenxi Huaxue* **25**, 1307-1310.
34. Y. Rao, Y. Tong, X.R. Zhang, G.A. Luo and W.R.G. Baeyens, (2000), Flow-injection chemiluminescence determination of fluoroquinolones, *Anal Lett.* **33**, 1117-1129.
35. Y. Rao, Y. Tong, X. Zhang, G. Luo and W.R.G. Baeyens, (2000), Determination of ofloxacin using a chemiluminescence flow-injection method, *Anal. Chim. Acta* **416**, 227-230.
36. Y.H. He, J.R. Lu, H.G. Zhang and J.X. Du, (2005), Molecular imprinting-chemiluminescence determination of norfloxacin using a norfloxacin-imprinted polymer as the recognition material, *Microchim. Acta* **149**, 239-244.
37. N. Lian, H.C. Zhai, C.Y. Sun, S.L. Chen, Y. Lu and L.P. Jin, (2003), A study on terbium sensitized chemiluminescence of ciprofloxacin and its application, *Microchem. J.* **74**, 223-230.
38. N. Lian, C.Y. Sun and H.C. Zhao, (2002), A study on terbium sensitized chemiluminescence of norfloxacin and its applications, *Fenxi Kexue Xuebao* **18**, 111-114.
39. L. Yi, H. Zhao, S. Chen, L. Jin, D. Zheng and Z. Wu, (2003), Flow-injection analysis of two fluoroquinolones by the sensitizing effect of terbium(III) on chemiluminescence of the potassium permanganate–sodium sulphite system, *Talanta* **61**, 403-409.
40. H.W. Sun, L.Q. Li and X.Y. Chen, (2006), Flow-injection enhanced chemiluminescence method for determination of ciprofloxacin in pharmaceutical preparations and biological fluids, *Anal. Bioanal. Chem.* **384**, 1314-1319

41. Y.D. Liang, J.F. Song and X.F. Yang, (2004), Flow-injection chemiluminescence determination of fluoroquinolones by enhancement of weak chemiluminescence from peroxy-nitrous acid, *Anal. Chim. Acta* **510**, 21-28.
42. H.Q. Wei, E.B. Liu, S.Q. Han and B.C. Xue, (2005), Determination of ofloxacin by chemiluminescence method, *Fenxi Kexue Xuebao* **21**, 152-154.
43. Z.K. He, H. Gao, L.J. Yuan, Q.Y. Luo and Y.E. Zeng, (1997), Simultaneous determination of oxalic and tartaric acid with chemiluminescence detection, *Analyst* **122**, 1343-1345
44. F.A. Aly, S.A. Al-Tamimi and A.A. Alwarthan, (2001), Chemiluminescence determination of some fluoroquinolone derivatives in pharmaceutical formulations and biological fluids using [Ru(bipy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>]-Ce(IV) system, *Talanta* **53**, 885-893.
45. K. Suzuki, Y.Aoki, Y.Kido, A. Tsuji, K.Ito and M. Maeda, (1999), Development of electrogenerated chemiluminescence HPLC for ofloxacin using tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(II) and its application to residual analysis in chicken tissues, *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* **40**, 23-28.
46. D.M. Hercules, and F.E. Lytle, (1966), Chemiluminescence from reduction reactions, *J. Am. Chem. Soc.* **88**, 4745-4746.
47. R.D. Gerardi, N.W. Barnett and S.W. Lewis, (1999), Analytical applications of tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(III) as a chemiluminescent reagent, *Anal. Chim. Acta* **378**, 1-41.
48. J.A. Murillo Pulgarín, L.F. García Bermejo and J.A. Rubio Aranda, (2004), Time-resolved chemiluminescence: a novel tool for improved emission sequence in stopped-flow analysis: Application to a kinetic study of the oxidation of naloxone, *Anal. Chim. Acta* **517**, 111-117.
49. X. Li, L. Ling, Z. He, G. Song, S. Lu, L. Yuan and Y. Zeng, (2000), Development of a chemiluminescence method for the simultaneous determination of pyruvic and tartaric acids in human serum based upon their reaction with cerium(IV) in the presence of rutheniumtrispyridine, *Microchem. J.* **64**, 9-13.
50. O.R. Idowu, and J.O. Peggins, (2004), Simple, rapid determination of enrofloxacin and ciprofloxacin in bovine milk and plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **35**, 143-153.
51. G.M. Greenway, and S.J.L. Dolman, (1999), Analysis of tricyclic antidepressants using electrogenerated chemiluminescence, *Analyst* **124**, 759-762.
52. A.W. Knight, G.M. Greenway and E.D. Chesmore, (1995), Development of a silicon photodiode, electrogenerated chemiluminescence, flow-through detector, *Anal. Proc.* **32**, 125-127.
53. A.M. García Campaña, W.R.G. Baeyens, X. Zhang and F. Alés Gamiz (2001), Unfamiliar though exciting analytical detection in flowing streams: Chemiluminescence, *Ars Pharmaceutica*, **42**, 81-107.
54. Z.D. Zhang, W. Baeyens, W. Zhang and G. Van derWeken, (1996), Chemiluminescence flow-injection analysis of captopril applying a sensitized rhodamine 6G method, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **14**, 939-945.
55. A. Martinez, J. Riu, O. Busto, J. Guasch and F.X. Rius, (2000), Validation of bias in multianalyte determination methods: Application to RP-HPLC derivatizing methodologies, *Anal. Chim. Acta* **406**, 257-278.
56. A.G. González, M.A. Herrador and A.G. Suero, (1999), Intra-laboratory testing of method accuracy from recovery assays, *Talanta* **48**, 729-736.
57. A.C. Olivieri, H.C. Goicochea and F.A. Iñón, (2004), MVC1: an integrated MatLab toolbox for first-order multivariate calibration, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **73**, 189-197.



58. D.M. Haaland and E.V. Thomas, (1988), Partial least-squares methods for spectral analyses. 1. Relation to other quantitative calibration methods and the extraction of qualitative information, *Anal. Chem.* **60**, 1193-1202.
59. D.M. Haaland and E.V. Thomas, (1988), Partial least-squares methods for spectral analyses. 2. Application to simulated and glass spectral data, *Anal. Chem.* **60**, 1202-1208.
60. C.A. Clayton, J.W. Hines and P.D. Elkins, (1987), Detection limits with specified assurance probabilities, *Anal. Chem.* **59**, 2506-2514.
61. G.L. Long, and J.D. Winefordner, (1983), Limit of detection. A closer look at the IUPAC definition, *Anal. Chem.* **55**, 712A-724A.

Table I. Analytical and statistical parameters for the determination of fluoroquinolones with the proposed method.

	CIP	NOR	OFL
Linear Range ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	1.3 - 30	1.4 - 43	0.7 - 15
Correlation coefficient	0.999	0.999	0.998
Linearity (%)	99	99	99
Sensitivity, $\gamma^{-1}$ ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	0.43	0.47	0.20
LOD* ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	0.96	1.05	0.48
LOD** ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	0.40	0.42	0.21

\* Clayton et al. ( $\alpha = \beta = 0.05$ ) [60]

\*\* Long and Winefordner ( $k = 3$ ) [61]

Table II. Effects of various excipients on the determination of CIP ( $15 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), NOR ( $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) and OFL ( $7.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

Excipient:fluoroquinolone 50:1	Recovery (% $\pm$ SD)		
	CIP	NOR	OFL
Citrate	101 $\pm$ 2	101 $\pm$ 1	100 $\pm$ 2
Manithol	103 $\pm$ 3	101 $\pm$ 1	98 $\pm$ 3
Lactose	102 $\pm$ 4	98 $\pm$ 1	99 $\pm$ 2
Sucrose	102 $\pm$ 4	101 $\pm$ 2	98 $\pm$ 2
Glucose	104 $\pm$ 3	99 $\pm$ 1	103 $\pm$ 1
Starch	98 $\pm$ 6	98 $\pm$ 2	99 $\pm$ 2

Table III. Recoveries in the determination of fluoroquinolones in commercial formulations.

Fluoro-quinolone	Commercial formulations	Fluoroquinolone nominal content	Recovery (% $\pm$ SD)		
			CL Method	HPLC Method Height	HPLC Method Area
CIP	CIPROXINA Simple	3 mg/mL	102 $\pm$ 3	103 $\pm$ 1	97 $\pm$ 1
	CATEX	250 mg/tablet	101 $\pm$ 1	101 $\pm$ 7	98 $\pm$ 4
	CUNESIN	250 mg/tablet	102 $\pm$ 1	103 $\pm$ 4	98 $\pm$ 3
NOR	AMICROBÍN	400 mg/tablet	102 $\pm$ 1	96 $\pm$ 1	99 $\pm$ 1
	ESCLEBIN	400 mg/tablet	100 $\pm$ 1	93 $\pm$ 1	97 $\pm$ 1
	CHIBROXIN	3 mg/mL	99 $\pm$ 1	96 $\pm$ 1	100 $\pm$ 1
OFL	EXOCIN 0.3 %	3 mg/mL	100 $\pm$ 1	102 $\pm$ 1	103 $\pm$ 1
	SURNOX 200	200 mg/tablet	103 $\pm$ 2	96 $\pm$ 1	96 $\pm$ 1
	OFLOVIR	200 mg/tablet	101 $\pm$ 1	101 $\pm$ 1	102 $\pm$ 1

Table IV. Composition of the calibration set composed of the samples of calibration (1-13) and prediction (14-18) sets.

Binary mixtures ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )				
Sample number	[OFL]	[CIP]	[OFL]	[NOR]
Samples of the calibration set				
1	2.19	4.44	2.92	5.85
2	7.50	4.44	9.94	5.85
3	12.8	4.44	17.0	5.85
4	2.19	14.9	17.0	20.0
5	7.50	14.9	9.94	20.0
6	12.8	14.9	17.0	20.0
7	2.19	25.7	2.92	34.1
8	7.50	25.7	9.94	34.1
9	12.8	25.7	17.0	34.1
10	0	14.9	0	20.0
11	14.9	14.9	20.3	20.0
12	7.50	0	9.94	0
13	7.50	29.7	9.94	40.1
Samples of the prediction set				
14	10.6	3.61	15.2	16.0
15	5.78	16.5	4.06	24.0
16	8.97	11.7	16.8	38.9
17	3.59	24.2	9.53	38.9
18	15.0	27.0	3.65	17.2

Table V. Recovery values obtained in the analysis of the prediction sets.

<b>Binary mixture CIP-OFL</b>					
<b>CIPROFLOXACIN</b>			<b>OFLOXACIN</b>		
Actual ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Predicted ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	% R	Actual ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Predicted ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	% R
3.60	4.43	123	10.57	10.09	95
16.47	13.64	83	5.78	6.35	110
11.67	13.04	112	8.97	9.39	105
24.25	23.53	97	3.59	3.74	104
26.998	26.57	98	15.01	15.37	102
<sup>a</sup> Average recovery		103 $\pm$ 15	<sup>a</sup> Average recovery		103 $\pm$ 5
Statistical parameters					
<sup>b</sup> RMSEP		1.50	<sup>b</sup> RMSEP		0.42
<sup>c</sup> REP, %		9.0	<sup>c</sup> REP, %		4.8
FACTORS		2	FACTORS		2
<b>Binary mixture NOR-OFL</b>					
<b>NORFLOXACIN</b>			<b>OFLOXACIN</b>		
Actual ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Predicted ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	% R	Actual ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Predicted ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	% R
16.03	17.34	108	15.21	14.43	95
24.05	22.01	92	4.06	3.83	95
38.88	34.81	90	9.53	9.62	101
23.25	23.07	99	9.53	9.75	102
17.23	17.68	103	3.65	3.19	87
<sup>a</sup> Average recovery		98 $\pm$ 7	<sup>a</sup> Average recovery		96 $\pm$ 6
Statistical parameters					
<sup>b</sup> RMSEP		2.13	<sup>b</sup> RMSEP		0.43
<sup>c</sup> REP, %		8.9	<sup>c</sup> REP, %		5.1
FACTORS		2	FACTORS		2

<sup>a</sup>Average recovery: Values between parenthesis correspond to the standard deviations computed for the recoveries of the five prediction samples.

<sup>b</sup>RMSEP: Root mean square error of prediction.

<sup>c</sup>REP, %: Relative error of prediction

## CAPTIONS

Figure 1. Estructure of A) Ciprofloxacin, B) Norfloxacin, C) Ofloxacin.

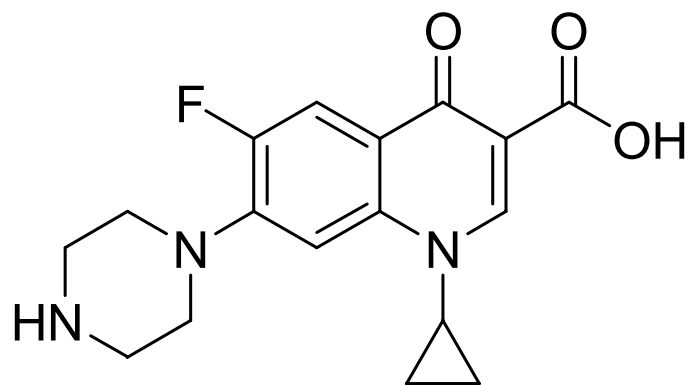
Figure 2. Schematic diagram of the continuous-flow manifold.

Figure 3. Effect of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentration on the maximum CL intensity. Ce (IV): 1.5 mM; Ru(bipy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>: 0.5 mM; A) CIP: 7.0 μg mL<sup>-1</sup>; B) NOR: 7.0 μg mL<sup>-1</sup>; C) OFL: 1.0 μg mL<sup>-1</sup>.

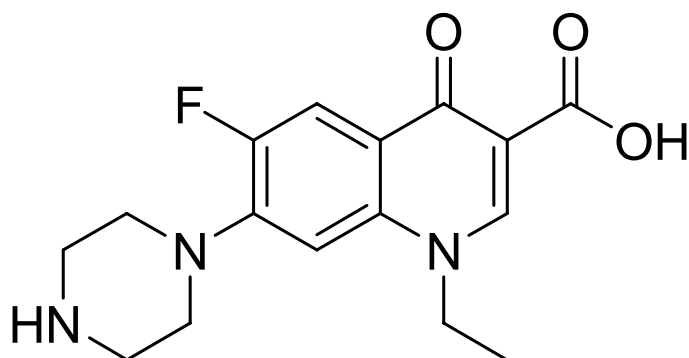
Figure 4. Effect of Ce (IV) concentration on the maximum CL intensity. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: 0.5 M; Ru(bipy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>: 0.5 mM; A) CIP: 7.0 μg mL<sup>-1</sup>; B) NOR: 7.0 μg mL<sup>-1</sup>; C) OFL: 1.0 μg mL<sup>-1</sup>.

Figure 5. Effect of Ru(bipy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> concentration on the maximum CL intensity. Ce (IV): 1.75 mM; H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: 0.5 M; A) CIP: 7.0 μg mL<sup>-1</sup>; B) NOR: 7.0 μg mL<sup>-1</sup>; C) OFL: 1.0 μg mL<sup>-1</sup>.

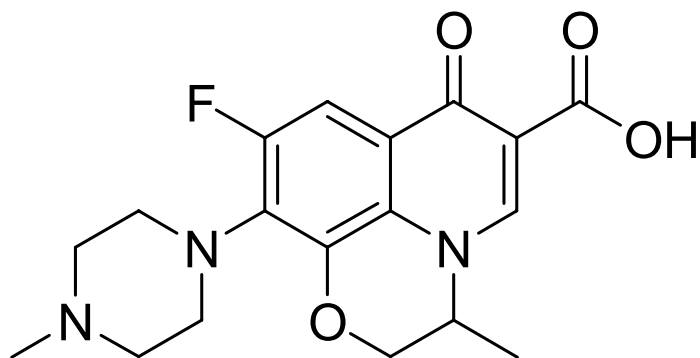
Figure 6. Time-resolved chemiluminescence signals for binary mixtures of ofloxacin plus ciprofloxacin A), and ofloxacin plus norfloxacin B).



A)

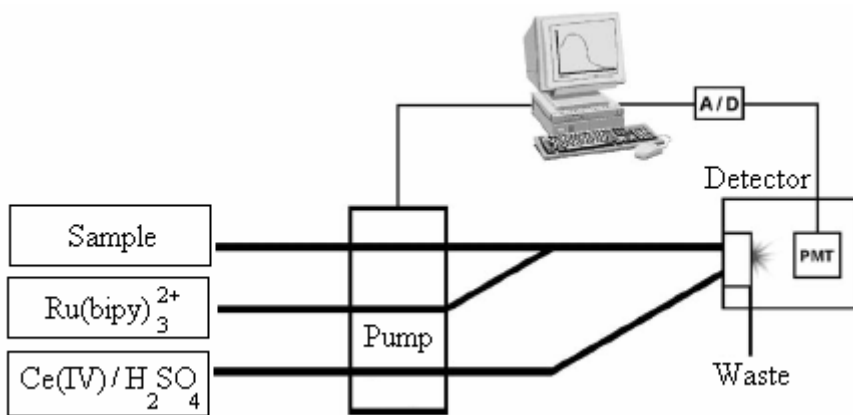


B)

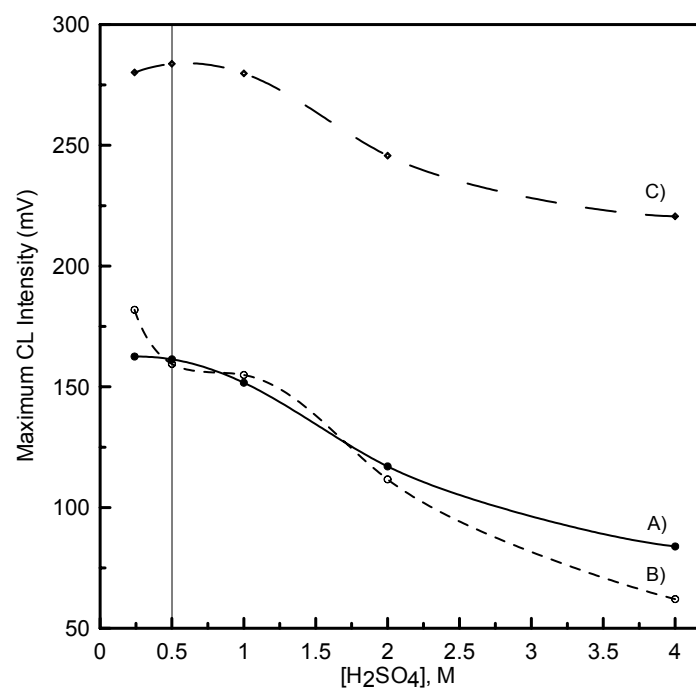


C)

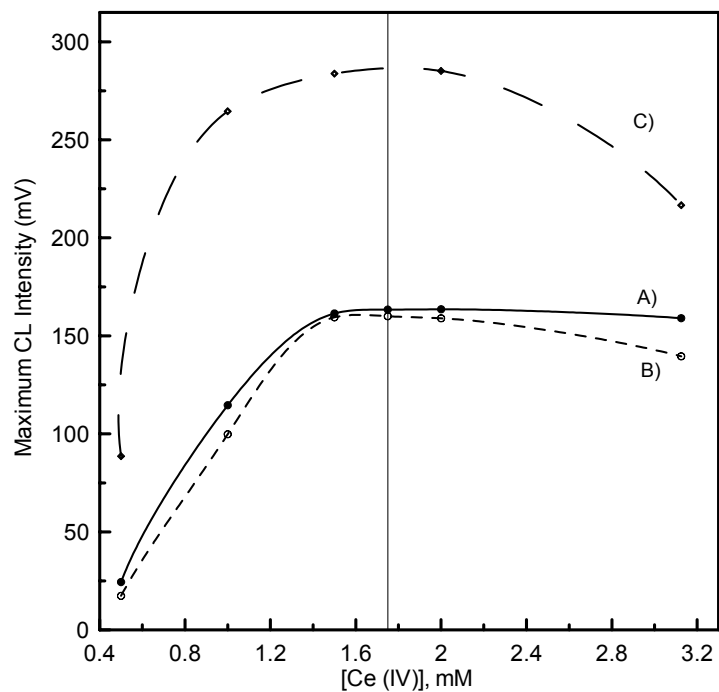
Figure 1



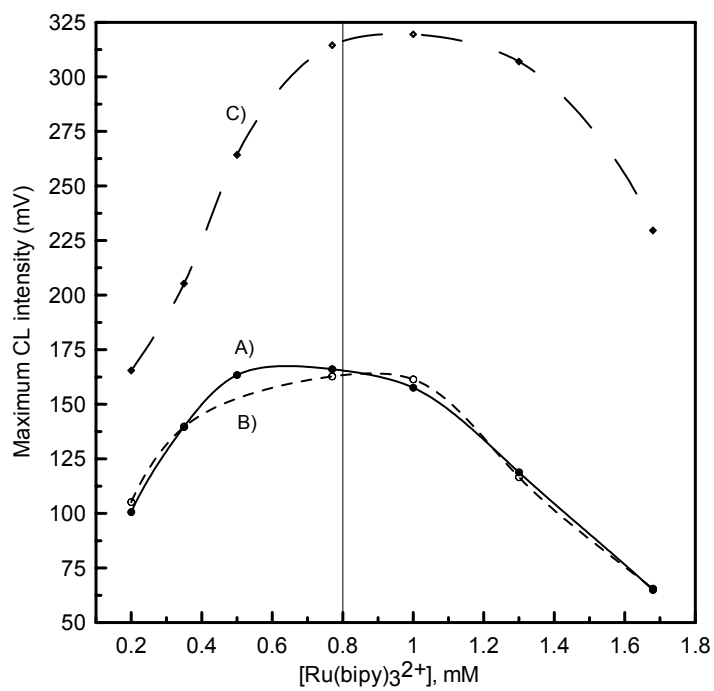
**Figure 2**



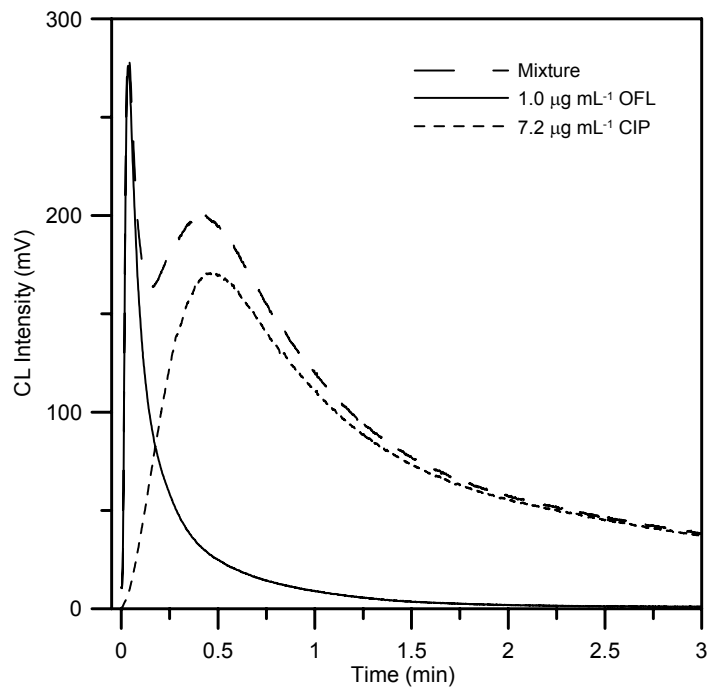
**Figure 3**



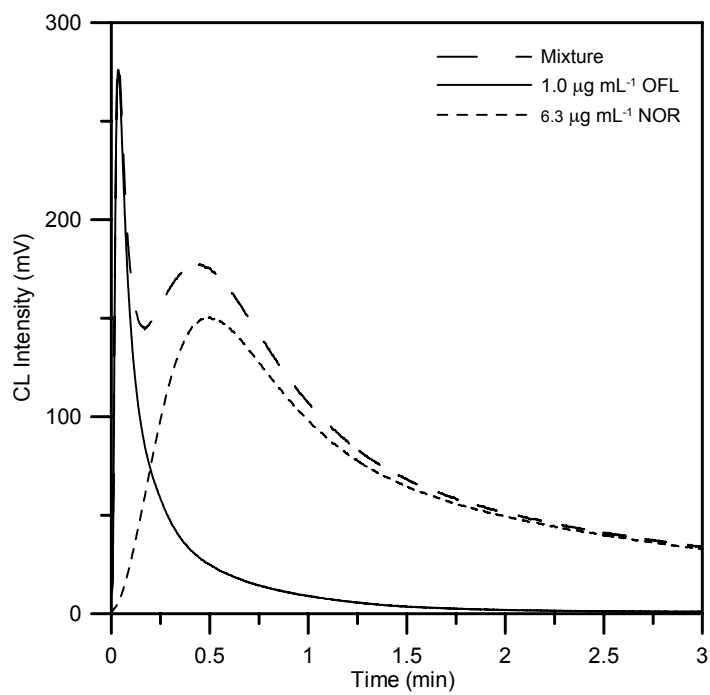
**Figure 4**



**Figure 5**



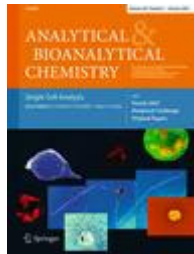
A)



B)

Figure 6





Analytical and Bioanalytical Chemistry, 385 (2006)1289-1297

**Four-way calibration applied to the simultaneous  
determination of folic acid and methotrexate in  
urine samples**



A. Muñoz de la Peña · I. Durán Merás ·  
A. Jiménez Girón

## Four-way calibration applied to the simultaneous determination of folic acid and methotrexate in urine samples

Received: 23 November 2005 / Revised: 15 February 2006 / Accepted: 6 March 2006 / Published online: 10 May 2006  
© Springer-Verlag 2006

**Abstract** First-, second- and third-order calibration methods were investigated for the simultaneous determination of folic acid and methotrexate. The interest in the determination of these compounds is related to the fact that methotrexate inhibits the body's absorption of folic acid and prolonged treatment with methotrexate may lead to folic acid deficiency, and to the use of folic acid to cope with toxic side effects of methotrexate. Both analytes were converted into highly fluorescent compounds by oxidation with potassium permanganate, and the kinetics of the reaction was continuously monitored by recording the kinetics curves of fluorescence emission, the evolution with time of the emission spectra and the excitation–emission matrices (EEMs) of the samples at different reaction times. Direct determination of mixtures of both drugs in urine was accomplished on the basis of the evolution of the kinetics of EEMs by fluorescence measurements and four-way parallel-factor analysis (PARAFAC) or multiway partial least squares (N-PLS) chemometric calibration. The core consistency diagnostic (CORCONDIA) was employed to determine the correct number of factors in PARAFAC and the procedure converged to a choice of three factors, attributed to folic acid, methotrexate and to the sum of fluorescent species present in the urine.

**Keywords** Four-way parallel-factor analysis · Multiway partial least squares · Excitation–emission matrices · Methotrexate · Folic acid

### Introduction

Methotrexate (MTX, amethopterin, 2,4-diamine-*N*, 10-methylpteroyl glutamic acid), an antimetabolic agent, is an antifolate in a class of folic acid analogs (Fig. 1) that

shows significant antitumor activity in acute leukemia and other neoplastic diseases [1, 2]. MTX is nephrotoxic owing to its low solubility in an acidic medium. When high doses of MTX are used in patients, these patients must be carefully monitored for life-threatening toxicity.

Folic acid (FA), 4-(2-amino-4-hydroxypteridin-6-yl) methylamino-benzoyl-L-glutamic acid (Fig. 1), part of the vitamin B group (vitamin B<sub>9</sub>), is a water-soluble vitamin. The interest in the determination of this compound lies in recent research which indicates that numerous diseases (e.g., macrocytic anemia associated with leukopenia, psychiatric disorders), especially those concerned with malformations during pregnancy and carcinogenic processes, are related to FA deficiency [3].

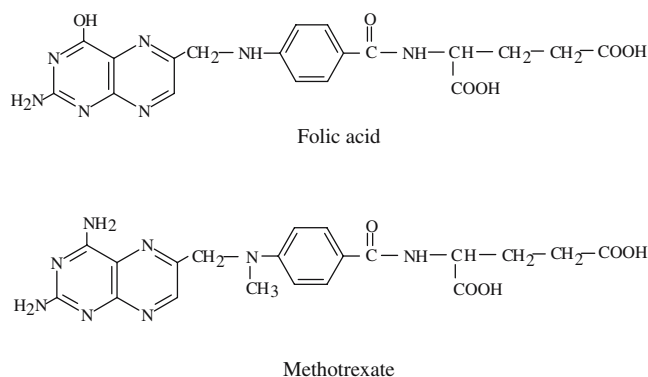
The interest in the simultaneous determination of MTX and FA is related to recent research reports which indicate that MTX inhibits the body's absorption of FA and, in consequence, prolonged treatment with MTX may lead to FA deficiency. In addition, FA prevents toxic side effects of MTX. For these reasons, FA is given simultaneously with MTX in rheumatoid arthritis treatments [4, 5].

Many analytical methods have been reported to analyze MTX in biological fluids, by using enzyme multiplied immunoassay [6], fluorescence polarization immunoassay [7], radioimmunoassay [8], capillary zone electrophoresis [9] and high-performance liquid chromatography (HPLC) [10–12].

A number of methods have consequently been reported for the determination of FA in different samples. The most widely used are those based on HPLC with absorbance [13–16] or fluorescence [17–20] detection, together with bioassays [21, 22] and voltamperometry [23, 24].

In recent years, multiway chemometric techniques have been introduced for the analysis of complex samples [25]. The advantage of using data involving high-dimensional structured information is the higher stability towards interferences and matrix effects, in comparison with first-order methodologies and, in some situations, multiway analysis allows for a direct separation of the measured signals into the underlying contributions from individual analytes.

A. Muñoz de la Peña (✉) · I. Durán Merás · A. Jiménez Girón  
Department of Analytical Chemistry,  
University of Extremadura,  
06071 Badajoz, Spain  
e-mail: arsenio@unex.es  
Tel.: +34-924-289378  
Fax: +34-924-289375



**Fig. 1** Structures of folic acid (FA) and of methotrexate (MTX)

Three-way data arrays, obtained by joining second-order data for a group of samples into a three-dimensional array, are particularly useful for the quantitative analysis of complex multicomponent samples, especially when they follow the trilinear parallel-factor analysis (PARAFAC) model. Most of the published analytical applications of three-way data are related to the use of excitation–emission matrices (EEMs) as the analytical signal [26]. A spectrofluorimeter provides second-order arrays per sample, leading to three-way arrays when data for a group of samples are joined. With modern fluorescence instrumentation, this can be done in a relatively short time and in an automatic manner.

The property that PARAFAC is able to quantify analytes without specific knowledge of the interferents has been coined the second-order advantage. This name is used because the advantage is obtained by using the second-order structure of the individual samples instead of merely rearranging the two-way data of each sample into a long vector of first-order structure.

Whereas second-order (three-way) calibration is intrinsically related to the special uniqueness properties of PARAFAC, four-way regression models are similar to their three-way analogs. The introduction of an additional dimension to three-way data sets allows a theoretical improvement of the predictive ability of the model, although its use has been scarce and only a few examples, involving the recording of the evolution of the kinetics of EEMs in cases in which a chemical reaction occurs, have been reported to date [27–31].

Tan et al. [27] followed the degradation reactions of chlorophyll a and b. The reaction was interrupted at 16 different times from 0 to 570 min, the corresponding EEMs were measured sequentially, and PARAFAC calibration was employed for resolving the four-way data obtained.

Nikolajsen et al. [28] determined adrenaline and noradrenaline concentrations from mixtures of catecholamines. Fluorescence EEMs were measured with a CCD camera for every sample, integrating for 15 s for each measurement, at 60 consecutive times, thereby creating a four-way data array; this was resolved by applying

PARAFAC and multiway partial least squares (N-PLS) algorithms.

Four-way fluorescence excitation–emission kinetics data were also employed for the determination of MTX and leucovorin in human urine [29, 30]. The data were processed by PARAFAC and by two new proposed methods for the analysis of four-way instrumental data: trilinear least squares (TLLS) and unfolded partial least squares (U-PLS) coupled to residual trilinearization.

Finally, 2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-*p*-dioxin was determined in water samples by application of PARAFAC to the four-way data array obtained by recording the time-resolved EEMs of phosphorescence of Shpol'skii matrices at liquid helium temperature [31].

The aim of the present report was to develop a multiway method for the simultaneous quantitation of MTX and FA, which is often administered together with MTX, for the reasons stated already [4, 5]. Both analytes were converted into highly fluorescent compounds by oxidation with potassium permanganate and the kinetics of the evolution of the fluorescence intensity, the evolution with time of emission spectra and the evolution with time of EEMs were recorded in order to apply first-, second- and third-order calibration methods. Coupling three- or four-way data with models such as PARAFAC ensures that the second-order advantage is achieved and permits the quantitation of calibrated analytes in the presence of uncalibrated components. Finally, owing to the complexity of the problem to be solved, third-order calibration methods were necessary and their use for determination of urine samples was investigated, and satisfactory results were obtained.

## Experimental

### Apparatus and software

Fluorescence spectral measurements were performed using a Varian Cary Eclipse fluorescence spectrophotometer, equipped with two Czerny-Turner monochromators and a xenon flash lamp, and connected to a PC microcomputer via an IEEE 488 (GPIB) serial interface. The Cary Eclipse software was used for data acquisition. Fluorescence measurements were recorded in a 10-mm quartz cell at 20 °C, by use of a thermostatic cell holder and a Selecta thermostatic bath.

All calculations were done using MatLab 5.3, using different routines and graphical interfaces: MVC1 [32], an integrated MatLab toolbox for first-order calibration, MVC2 and MVC3, developed by A.C. Olivieri (Universidad Nacional de Rosario, Rosario, Argentina), which allowed us to perform second- and third-order calibrations, respectively.

### Reagents

All experiments were performed with analytical reagent grade chemicals. FA and MTX were obtained from Sigma.

**Table 1** Composition of calibration and test sets

	FA ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	MTX ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
Calibration set		
P1	0.146	0.146
P2	0.146	0.500
P3	0.146	0.854
P4	0.500	0.146
P5	0.500	0.500
P6	0.500	0.854
P7	0.854	0.146
P8	0.854	0.500
P9	0.854	0.854
P10	0.500	0.000
P11	0.500	1.000
P12	0.000	0.500
P13	1.000	0.500
Test set		
T1	0.512	0.341
T2	0.341	0.341
T3	0.683	0.154
T4	0.137	0.512
T5	0.597	0.768
T6	0.154	0.427

FA folic acid, MTX methotrexate

Ultrapure water was obtained from a Milli-Q system (Waters Millipore). Stock standard solutions of FA and MTX were prepared by dissolving 0.010 g of these compounds in 100 mL of alkalized ultra-pure-grade water. Exposure to direct sunlight was avoided. Working FA and MTX solutions of different concentrations were prepared by dilution of stock solutions with ultrapure water. Buffer solution (pH 3.4,  $C_t=0.5$  M) was prepared from chloroacetic acid and sodium chloroacetate (Panreac). A  $4.2 \times 10^{-4}$  M  $\text{KMnO}_4$  (Panreac) stock solution was also prepared with ultrapure water.

#### Calibration and test sets

In this work, the method of external calibration was employed. For this purpose, a calibration set of 13 samples was constructed, using a central composite design combined with a three-factorial design. The levels correspond to values in the range 0–1  $\text{mg L}^{-1}$  for FA and MTX (Table 1). Reagents were mixed in the measuring cell, by pipetting an appropriate volume of FA and MTX solution, and adding deionized water, if necessary, to make up to 1 mL, 1 mL of 0.12 M chloroacetic/chloroacetate buffer solution and 1 mL of  $4.2 \times 10^{-5}$  M  $\text{KMnO}_4$  solution. The instrument was set up as follows: bandpass<sub>ex/em</sub>(nm/nm) of monochromators of 5/10, detector voltage 550 V and 20 °C.

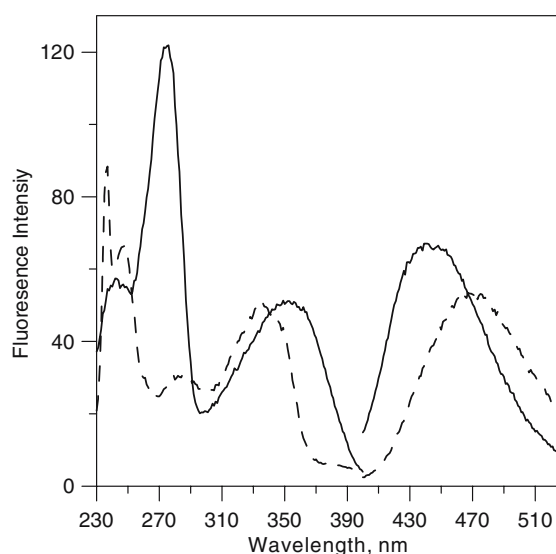
The fluorescence–time curves, the evolution with time of the emission spectra and of the EEMs of these solutions were then recorded, and the data obtained were subjected to two-, three- and four-way analysis, as described later. The

kinetics curve ( $\lambda_{\text{ex}}=350$  nm,  $\lambda_{\text{em}}=460$  nm) was scanned up to 10 min, with a resolution of 1 s. Thirteen emission spectra were recorded in the range 400–530 nm at 1-nm intervals ( $\lambda_{\text{ex}}=350$  nm). The emission spectra were obtained at intervals of 0.8 min, for reaction times ranging from 0 to 9.8 min. EEMs were recorded in the ranges 260–380 nm at 6-nm intervals for excitation, and 400–510 nm at 5-nm intervals for emission. The rapid-scanning instrument allows the acquisition of a complete EEM in 0.2 min at a wavelength scanning speed of 24,000  $\text{nm min}^{-1}$ . Ten EEMs were obtained at intervals of 1 min. It should be noted that if the reaction significantly evolves during spectral acquisition, the data sample would not be strictly trilinear. In our case, we did not find this problem to be important.

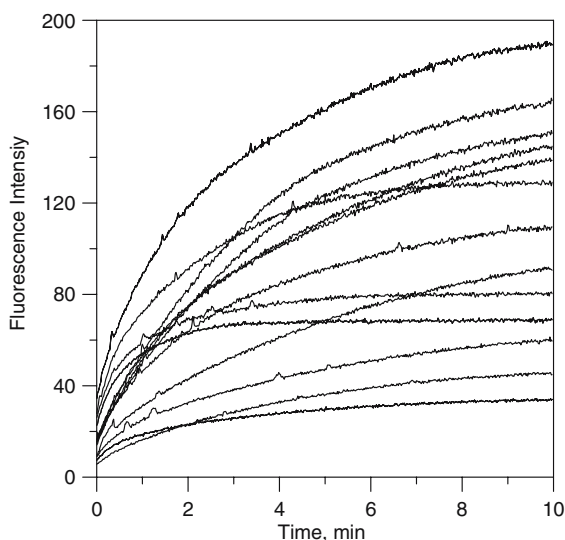
The total range recorded for the emission spectra and for EEMs was not used. It was optimized while the calibration was being made, and Rayleigh scattering and diffraction grating harmonics were avoided.

Two test sets were used. The first one, composed of six synthetic samples (Table 1), was prepared in the same way as the samples for calibration, but using a random design, i.e., selecting the target concentrations of both analytes at random from the calibration range for each analyte (see later for details on the composition of these samples). The second one was composed of seven urine samples.

Volumes of 120  $\mu\text{L}$  of real urine samples (taken from healthy individuals) were diluted to 10 mL and spiked with different concentrations of both analytes, selected at random from their corresponding calibration ranges. Then, 1 mL of these solutions was placed in the quartz cell and treated as described for the calibration and test sets, except for the potassium permanganate concentration, which was increased until  $1.4 \times 10^{-4}$   $\text{mol L}^{-1}$  to achieve the complete oxidation of the analytes. The calibration stage was repeated under these conditions. The level of urine dilution implies that the present calibration scheme covers



**Fig. 2** Excitation and emission spectra of the oxidation products of  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  FA (solid line) and MTX (broken line) in the presence of  $1.4 \times 10^{-5}$  M  $\text{KMnO}_4$ , pH 3.4



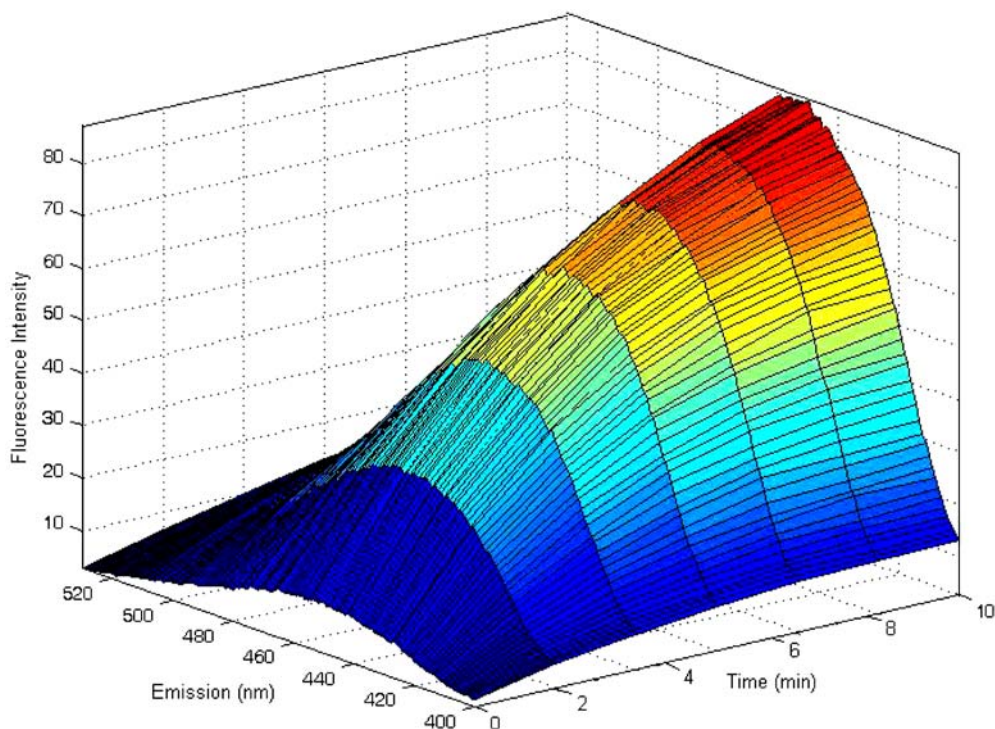
**Fig. 3** Kinetics curves obtained for the calibration set of 13 samples

concentration ranges up to  $250 \text{ mg L}^{-1}$  for FA and MTX. For MTX, these values are comparable to those found in patients [33, 34].

### Theory

For the first-order calibration, partial least squares (PLS) [35, 36] was used, whereas for second-order calibration, N-PLS, U-PLS [37], PARAFAC [38], self-weighted alternating trilinear decomposition (SWATLD) [39] and bilinear least squares (BLLS) [40, 41] were employed.

**Fig. 4** Evolution of emission spectra for the calibration sample P5



In what follows, we employ the PARAFAC, N-PLS and TLLS models for analyzing the experimental four-way data. The third-order calibration method TLLS is derived from its second-order counterpart BLLS and is discussed in detail in the relevant references; it is a promising alternative to PARAFAC [29, 30]. In N-PLS [37], the four-way analysis of independent variables is decomposed into a quadrilinear model, which, however, is not fitted in a least-squares sense. According to the philosophy of PLS, it intends to describe the covariance of the dependent and the independent variables. Although the N-PLS model is unique, the uniqueness in this case does not imply that real underlying phenomena, such as pure analyte spectra, can be recovered, because the model assumptions do not reflect any fundamental or theoretical model.

A brief account of PARAFAC achieving the second-order advantage is provided. Third-order data are measured for a given sample as a  $J \times K \times L$  array, where  $J$ ,  $K$  and  $L$  denote the number of emission wavelengths, excitation wavelengths and time points in each of the three dimensions. For obtaining the second-order advantage, the  $I$  training arrays  $\underline{X}_{i,\text{cal}}$  are joined with the unknown sample array  $\underline{X}_u$  into a four-way data array  $\underline{X}$ , whose dimensions are  $[(I+1) \times J \times K \times L]$ . Provided  $\underline{X}$  follows a quadrilinear PARAFAC model, it can be written in terms of four vectors for each responsive component, designated as  $\mathbf{a}_n$ ,  $\mathbf{b}_n$ ,  $\mathbf{c}_n$  and  $\mathbf{d}_n$ , and collecting the relative concentrations  $[(I+1) \times 1]$  for component  $n$ , and the profiles in the three

**Table 2** Results obtained in the analysis of the test set of synthetic samples by different second-order calibration methods

	N-PLS		U-PLS		PARAFAC		SWATLD		BLLS	
	Rec (%)	REP (%)	Rec (%)	REP (%)	Rec (%)	REP (%)	Rec (%)	REP (%)	Rec (%)	REP (%)
FA	117 (11)	15.8	116 (11)	15.6	150 (66)	38.0	136 (43)	44.6	108 (18)	20.5
MTX	100 (10)	9.9	100 (11)	9.9	120 (46)	21.1	113 (27)	19.7	88 (22)	13.3

Values in parentheses correspond to the standard deviations computed for the recoveries of the six test samples

*N-PLS* multiway partial least squares, *U-PLS* unfolded partial least squares, *PARAFAC* parallel-factor analysis, *SWATLD* self-weighted alternating trilinear decomposition, *BLLS* bilinear least squares, *Rec* average recovery, *REP* relative error of prediction

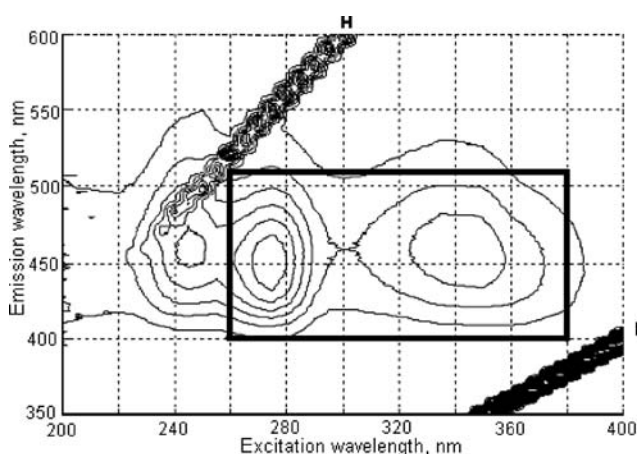
modes ( $J \times 1$ ), ( $K \times 1$ ) and ( $L \times 1$ ) respectively. The specific expression is thus [42]

$$X_{ijkl} = \sum_{n=1}^N a_{in} b_{jn} c_{kn} d_{ln} + E_{ijkl}, \quad (1)$$

where  $N$  is the total number of responsive components,  $a_{in}$  is the relative concentration of component  $n$  in the  $i$ th. sample, and  $b_{jn}$ ,  $c_{kn}$  and  $d_{ln}$  are the normalized intensities at the emission wavelength  $j$ , excitation wavelength  $k$  and time  $l$ , respectively. The values of  $E_{ijkl}$  are the elements of the array  $\mathbf{E}$ , which is a residual error term of the same dimensions as  $\mathbf{X}$ . The column vectors  $\mathbf{a}_n$ ,  $\mathbf{b}_n$ ,  $\mathbf{c}_n$  and  $\mathbf{d}_n$  are collected into the corresponding loading matrices  $\mathbf{A}$ ,  $\mathbf{B}$ ,  $\mathbf{C}$  and  $\mathbf{D}$  ( $\mathbf{b}_n$ ,  $\mathbf{c}_n$  and  $\mathbf{d}_n$  are usually normalized to unit length).

The model described by Eq. 1 defines a decomposition of  $\mathbf{X}$ , which provides access to emission ( $\mathbf{B}$ ) and excitation ( $\mathbf{C}$ ) spectral profiles, time profiles ( $\mathbf{D}$ ) and relative concentrations ( $\mathbf{A}$ ) of individual components in the ( $I+1$ ) mixtures, whether they are chemically known or not. This constitutes the basis of the second-order advantage. The decomposition is usually accomplished through an alternating least-squares minimization scheme [38, 43].

Issues relevant to the application of the PARAFAC model for multiway calibration of four-way data are (1)

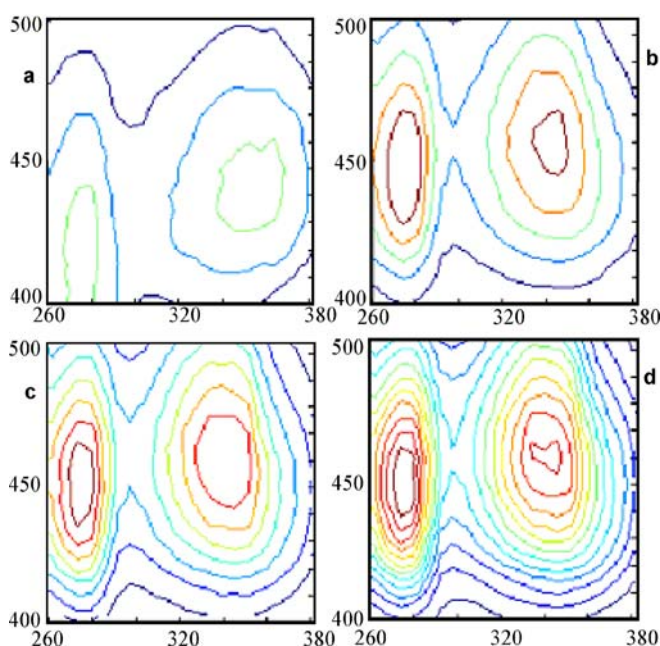


**Fig. 5** Contour plot of an excitation–emission matrix (*EEM*) for an aqueous solution (pH 3.4) containing  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  FA and  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  MTX, in the presence of  $1.4 \times 10^{-5}$  M  $\text{KMnO}_4$ , showing the presence of diffraction grating harmonics (*H*) and Rayleigh scattering (*R*). The rectangle illustrates the spectral excitation and emission ranges selected for recording the EEMs

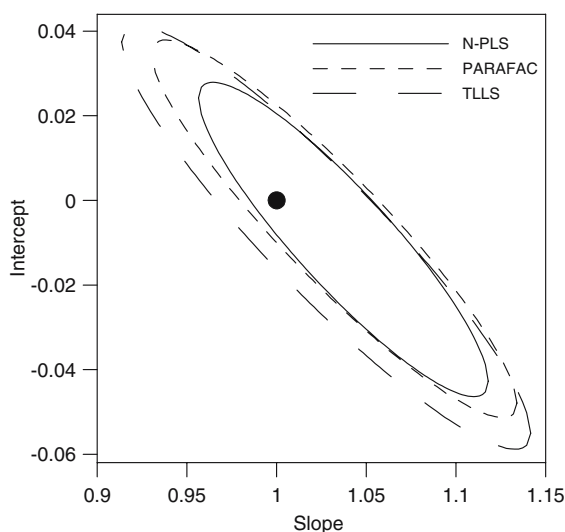
establishing the number of responsive components, (2) identifying specific components from the information provided by the model and (3) calibrating the model in order to obtain absolute concentrations for a particular component in an unknown sample.

The number of responsive components ( $N$ ) can be estimated by several methods. A useful technique is CORCONDIA, a diagnostic tool considering the PARAFAC internal parameter known as core consistency [44]. Identification of the chemical constituent under investigation is done with the aid of the three estimated mode profiles, the emission spectrum, the excitation spectrum and the kinetics profile, and by comparing them with those for a standard solution of the analyte of interest. This is required since the components obtained by decomposition of  $\mathbf{X}$  are sorted according to their contribution to the overall spectral variance, and this order is not necessarily maintained when the unknown sample is changed.

Absolute analyte concentrations are obtained after calibration, because the four-way array decomposition only provides relative values ( $\mathbf{A}$ ). Calibration is done by means of the set of standards with known analyte



**Fig. 6** Contour plots of the EEMs for an aqueous solution (pH 3.4) containing  $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$  FA and  $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$  MTX, as a function of the time of permanganate oxidation. Time selected to illustrate the evolution of the kinetics of the EEMs (in minutes): **a** 0, **b** 3, **c** 6 and **d** 9



**Fig. 7** Elliptical joint confidence regions for the slope and intercept of the regression of predicted concentration vs nominal values in the test set

concentrations (contained in an  $I \times 1$  vector  $\mathbf{y}$ ), and regression of the first  $I$  elements of column  $\mathbf{a}_n$  against  $\mathbf{y}$ :

$$k = \mathbf{y}^+ \times [a_{1n} | \dots | a_{In}], \quad (2)$$

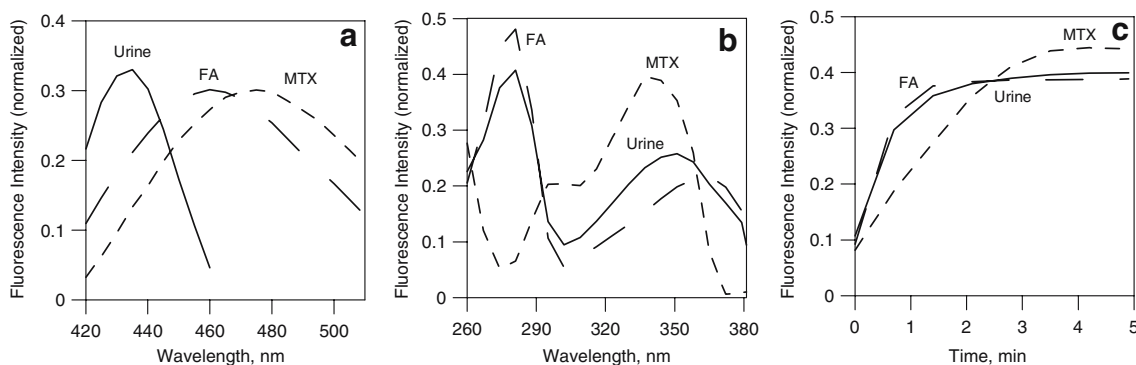
where the plus sign implies taking the pseudo-inverse. Conversion of relative to absolute concentration of  $n$  in the unknown proceeds by division of the last element of column  $\mathbf{a}_n$  [ $a_{(I+1)n}$ ] by the slope of the calibration graph  $k$ :

$$y_u = a_{(I+1)n} / k. \quad (3)$$

## Results and discussion

### Fluorimetric kinetics study of the analytes

FA and MTX are weakly fluorescent compounds but their oxidation, in the presence of potassium permanganate, generated two products which are strongly fluorescent. The



**Fig. 8** Profiles extracted by the parallel-factor analysis model for sample 2 (Table 4). **a** Emission spectral profiles, **b** excitation spectral profiles and **c** kinetics profiles. The numbers indicate the

instrumental and experimental parameters of the corresponding oxidation reactions were studied and optimized in order to obtain the appropriate kinetics and fluorescence properties of the products formed. Wittle et al. [45] described how permanganate oxidation of FA gives rise to two main fragments, a strongly fluorescent substance identified as 2-amino-4-hydroxy-pteridine-6-carboxylic acid and a second, non-pteridine component. Figure 2 shows the excitation and emission spectra of the oxidation products in the presence of potassium permanganate obtained at 10 min of reaction time, using  $\lambda_{\text{ex}}=350$  nm and  $\lambda_{\text{em}}=460$  nm. A strong overlap between their fluorescence spectra can be noted.

To develop these oxidation reactions, several pH values were tested, and an optimum value of 3.4 was selected, for which the reaction rates and the fluorescence intensities were adequate. A chloroacetic/chloroacetate buffer ( $\text{p}K_a$  2.85) was employed, and  $0.04 \text{ mol L}^{-1}$  was selected as the optimum concentration.

The influence of potassium permanganate concentration was studied in the range between  $10^{-5}$  and  $7 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ . It was found that, when the  $\text{KMnO}_4$  concentration increased, the oxidation was completed in a shorter time and the fluorescence intensity of the oxidation products decreased with the  $\text{KMnO}_4$  concentration, except for the minor concentrations assayed, where the fluorescence was higher and constant. A potassium permanganate concentration of  $1.4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  was selected as optimum.

The influence of temperature was studied between 15 and  $40^\circ\text{C}$ . The reaction rates increased exponentially with temperature and the fluorescence of the oxidation products decreased, because there was more probability of deactivation of the excited state by nonradiative mechanisms. Considering both effects,  $20^\circ\text{C}$  was selected as a compromise value.

The ratio of the reaction rate to the instrumental noise was studied by modifying the detector voltage and the bandpass of the monochromators. It was found that the maximum ratio was obtained when 550 V and a bandpass<sub>ex/em</sub>(nm/nm) of 5/10 were employed.

order of the factor. In all cases, the analyte profiles were identified by comparison with standards, with the remaining ones corresponding to the urine background (as indicated)



**Table 3** Statistical parameters and results obtained in the analysis of the test set of synthetic samples by the different third-order calibration methods

	Range	N-PLS		PARAFAC		TLLS	
		Rec (%)	REP (%)	Rec (%)	REP (%)	Rec (%)	REP (%)
FA	Emission: 420–505 nm Excitation: 266–374 nm Time: 0–5 min	102 (5)	5.1	96 (7)	3.7	95 (9)	6.2
MTX	Emission: 455–510 nm Excitation: 302–362 nm Time: 0–5 min	100 (5)	4.7	104 (5)	8.1	103 (5)	7.0

Values in *parentheses* correspond to the standard deviations computed for the recoveries of the six test samples. TLLS trilinear least squares

### First- and second-order calibration methods

Using the optimum instrumental–chemical conditions, the fluorescence-time signals at  $\lambda_{\text{ex}}=350$  nm and  $\lambda_{\text{em}}=460$  nm were recorded between 0 and 10 min for the calibration and test sets. Previously, it was verified that the signals are additives. Figure 3 shows the kinetics curves obtained for the calibration set of samples (Table 1). These reactions were previously used for the individual determination of MTX in human serum [46] and for the HPLC fluorimetric detection of FA [20]. Using the MVC1 interface, PLS-1 was applied in synthetic samples, to the fluorimetric kinetics data, without providing good results in the determination of both analytes. For this reason, second-order calibration methods were employed.

The evolution with time of the emission spectra was recorded (Fig. 4) and, using the MVC2 interface, N-PLS/U-PLS, PARAFAC, SWATLD and BLLS were applied to synthetic samples. The emission range used was between 400 and 530 nm, and the time range employed was between 0 and 9.6 min. The number of factors found in all cases was two, calculated according to the Haaland and Thomas criterion for N-PLS and U-PLS [35, 36] and according with the CORCONDIA criterion for PARAFAC, SWATLD and BLLS [44]. In Table 2 the results obtained in

the analysis of the test set of synthetic samples are summarized. In general, the recovery values for FA were worse than those for MTX, with the standard deviations being values unacceptable taking into account that there is no interference in the synthetic samples. The relative errors of prediction were also elevated and the worst results were obtained when applying PARAFAC and SWATLD for the FA determination.

Owing to the inability of second-order calibration methods to resolve this complicated mixture, third-order calibration methods were investigated for the determination of FA and MTX.

### Third-order calibration methods

Figure 5 shows the contour plot corresponding to the EEM for a sample containing FA and MTX after reaction with potassium permanganate at a reaction time of 10 min. It was recorded in wide spectral excitation and emission ranges, 200–400 and 350–600 nm, respectively, and shows Rayleigh scattering and second harmonics from the diffraction grating. These latter signals are undesired because they are not correlated with the target concentrations of the analytes studied. Therefore, for calibration and

**Table 4** Results obtained when applying N-PLS and PARAFAC in the analysis of urine samples

FA					MTX				
Actual	N-PLS		PARAFAC		Actual	N-PLS		PARAFAC	
	Predicted	Rec (%)	Predicted	Rec (%)		Predicted	Rec (%)	Predicted	Rec (%)
0.511	0.508	99	0.401	79	0.338	0.391	116	0.357	106
0.340	0.372	109	0.340	100	0.338	0.300	89	0.295	87
0.681	0.618	91	0.628	92	0.152	0.268	176	0.170	112
0.136	0.230	169	0.121	89	0.506	0.440	87	0.409	81
0	–	–	–	–	0.962	0.818	85	0.952	99
0.987	0.846	86	0.736	75	0	–	–	–	–
0.680	0.480	70	0.522	77	0.675	0.680	101	0.664	98
Av Rec (%)	104 (34)		85 (10)		Av Rec (%)	109 (35)		97 (11)	
REP (%)	20		23		REP (%)	17		9	

Values in *parentheses* correspond to the standard deviations computed for the recoveries of the seven urine samples. Av Rec average recovery

prediction purposes, the EEMs were subsequently recorded, as a function of time, in the sensibly restricted excitation and emission ranges bordered by the rectangle in Fig. 5.

Figure 6 shows the four-way data array structure used in this work, following the evolution with time of the EEM of one of the calibration mixtures in the presence of potassium permanganate. It can be seen that the fluorescence intensity of the analytes increases considerably as a function of reaction time. This provided sensitivity for the determination which is significantly larger than that achieved in the absence of oxidant.

The set of six test binary samples (Table 1) was investigated with the aid of N-PLS, PARAFAC and TLLS, employing the MVC3 interface. The emission, excitation and time ranges selected for FA and MTX, the statistical parameters and the results obtained in the analysis of the test set of synthetic samples are collected in Table 3. The number of factors found in all cases was two, calculated according to the Haaland and Thomas criterion for N-PLS and U-PLS [35, 36] and according to the CORCONDIA criterion for PARAFAC and TLLS [44]. The results obtained for the two analytes are satisfactory for all the methods employed and are considerably better than those obtained with second-order calibration methods.

The elliptical joint confidence region of the regression [47, 48] of predicted versus nominal concentrations in the test set was studied for the three third-order calibration methods. The corresponding plots are shown in Fig. 7: all confidence regions contain the ideal point of unit slope and zero intercept (indicating accuracy), and the ellipsis sizes are similar, suggesting that the chemometric methodologies show similar predictive ability.

### Urine samples

The set of urine samples was investigated with the aid of N-PLS and PARAFAC. In this case, core consistency analysis was applied for each newly analyzed sample, since there is no guarantee that each unknown urine sample will behave in the same manner as the previously studied ones. The result was that all urine samples required the consideration of three factors: two for the analytes and the remaining one for the urine background.

Figure 8 shows the **B**, **C** and **D** profiles and (loading for emission, excitation and kinetics profiles) provided by PARAFAC when processing sample 2 (Table 4) together with the calibration set, where the components have been labeled according to the order assigned by the model in the specific data array under investigation. They appear in the order of their contribution to the overall variance, and in this particular case, the interference appears in second place, indicating that it is the second source of fluorescence intensity across this particular data array.

The prediction results for the spiked urine set, when analyzing the data by the N-PLS and PARAFAC models, are presented in Table 4. A comparison of the predictive ability of both models indicates that statistically similar

results were obtained in this particular case. All predictions are seen to be reasonable for samples with the complexity of human urine.

## Conclusions

Different multiway calibration methods were employed in order to determine MTX and FA mixtures in a complex biological sample, for which the fluorescence spectra of the components of the mixture overlap greatly. The introduction of an additional dimension to three-way data sets allows a theoretical improvement of the predictive ability of the model, although its use has been scarce to date. This has been proved in this work, in which owing to the complexity of the problem to be solved, third-order calibration methods were necessary and the determination of these analytes in urine samples was assayed, and satisfactory results were obtained. The use of four-way arrays of data exploiting the information contained in a full fluorescence EEM spectrum, in combination with kinetics methods, is a promising tool for complex multicomponent analysis.

**Acknowledgement** Financial support from the Ministerio de Educación y Ciencia of Spain (Project CTQ2005-02389) is acknowledged.

## References

1. Bleyer WA (1978) *Cancer* 41:36–51
2. Kimura K, Wang YM (1986) *Methotrexate in cancer therapy*. Raven, New York
3. Oakley GP, Adams MJ, Dickinson CM (1996) *J Nutr* 126:751–755
4. Morgan SL, Baggott JE, Lee JY, Alarcon GS (1998) *J Rheumatol* 25:441–446
5. Abd El-Hady D, Abo El-Maali N, Gotti R, Bertucci C, Manzini F, Andrisano V (2005) *J Pharm Biomed Anal* 37:919–925
6. De Porcer-Morton C, Vhuang J, Specker M, Bastian R (1978) Performance evaluation of EMIT methotrexate assay. Syva, Palo Alto
7. Pesce MA, Bodourian SH (1986) *Ther Drug Monit* 8:115–121
8. Raso V, Schreider R (1975) *Cancer Res* 35:1407–1410
9. Kuo CY, Wu HL, Kuo SH, Chiou SS, Wu DC, Wu SM (2003) *J Chromatogr A* 1014:93–101
10. Beck O, Seideman P, Wennberg M, Peterson C (1991) *Ther Drug Monit* 13:528–532
11. Mader RM, Rizouski B, Steger GG, Rainer H (1993) *J Chromatogr B* 613:311–316
12. Lu GW, Jun HW (1995) *J Liquid Chromatogr* 18:155–171
13. El-Gizawy SM, Ahmed AN, El-Rabbat AN (1991) *Anal Lett* 24:1173–1181
14. Osseyi ES, Wehling RL, Albrecht JA (1998) *J Chromatogr A* 826:235–240
15. Akhtar MJ, Khan MA, Ahmad I (1997) *J Pharm Biomed Anal* 16:95–99
16. Albala-Hurtado S, Veciana-Nogues MT, Izquierdo-Pulido M, Marine-Font A (1997) *J Chromatogr A* 778:247–253
17. Holt D, Wheling RL, Zeece MG (1988) *J Chromatogr* 449:271–279
18. Leeming RJ, Pollock A, Melville JL, Hamon CGB (1990) *Metab Clin Lab* 39:902–904
19. Konings EJM (1999) *J AOAC Int* 82:119–127

20. Ichinose N, Tsuneyoshi T, Kato M, Suzuki T, Ikeda S (1993) *Fresenius' J Anal Chem* 346:841–846
21. Engelhardt R, Gregory JF (1990) *J Agric Food Chem* 38:154–158
22. Kelly P, McPartlin J, Scott J (1996) *Anal Biochem* 238:179–183
23. Villamil MJF, Mairanda Ordieres AJ, Costa Garcia A, Tuñon Blanco P (1993) *Anal Chim Acta* 273:377–382
24. White DR, Lee HS, Kruger RE (1991) *J Agric Food Chem* 39:714–717
25. Faber NM, Bro R, Hopke PK (2003) *Chemom Intell Lab Syst* 65:119–137
26. Andersen CM, Bro R (2003) *J Chemom* 17:200–215
27. Tan YX, Jiang JH, Wu HL, Cui H, Yu RQ (2000) *Anal Chim Acta* 412:195–202
28. Nikolajsen RPH, Booksh KS, Hansen AM, Bro R (2003) *Anal Chim Acta* 475:137–150
29. Olivieri AC, Arancibia JA, Muñoz de la Peña A, Durán-Merás I, Espinosa Mansilla A (2004) *Anal Chem* 76:5657–5666
30. Arancibia JA, Olivieri AC, Bohoyo Gil D, Espinosa Mansilla A, Durán-Merás I, Muñoz de la Peña A (2006) *Chemom Intell Lab Syst* 80:77–86
31. Goicoechea HC, Yu S, Olivieri AC, Campiglia AD (2005) *Anal Chem* 77:2608–2616
32. Olivieri AC, Goicoechea HC, Inon FA (2004) *Chemom Intell Lab Syst* 73:189–197
33. Rubino FM (2001) *J Chromatogr B* 764:217–254
34. Crom WR, Evans WE (1992) Methotrexate. In: Evans WE, Schentang JJ, Jusko WJ (eds) *Applied pharmacokinetics. Principles of therapeutic drug monitoring*. 3rd edn. Applied therapeutics, Vancouver
35. Haaland DM, Thomas EV (1988) *Anal Chem* 60:1202–1208
36. Haaland DM, Thomas EV (1988) *Anal Chem* 60:1193–1202
37. Bro R (1996) *Chemom Intell Lab Syst* 10:47–61
38. Bro R (1997) *Chemom Intell Lab Syst* 38:149–171
39. Chen ZP, Wu HL, Jiang JH, Li Y, Yu RQ (2000) *Chemom Intell Lab Syst* 52:75–86
40. Linder M, Sundberg R (1998) *Chemom Intell Lab Syst* 42:159–178
41. Linder M, Sundberg R (2002) *J Chemom* 16:12–27
42. Leurgans S, Ross RT (1992) *Statist Sci* 7:289–319
43. Paatero P (1997) *Chemom Intell Lab Syst* 38:223–242
44. Bro R, Kiers HAL (2003) *J Chemom* 17:274–286
45. Wittle EL, O'Dell BL, Vandenbelt JM, Pfiffner JJ (1947) *J Am Chem Soc* 69:1786–1792
46. Espinosa Mansilla A, Durán Merás I, Zamora Madera A, Pedano L, Ferreira C (2002) *J Pharm Biomed Anal* 29:851–858
47. Riu J, Rius FX (1997) *Trends Anal Chem* 16:211–216
48. del Río FJ, Riu J, Rius FX (2001) *Anal Chim Acta* 446:49–58





Talanta (2007) doi: 10.1016/j.talanta.2007.01.018

**Evaluation of unfolded-partial least-squares coupled to residual trilinearization for four-way calibration of folic acid and methotrexate in human serum samples**





## Evaluation of unfolded-partial least-squares coupled to residual trilinearization for four-way calibration of folic acid and methotrexate in human serum samples

A. Muñoz de la Peña<sup>a,\*</sup>, I. Durán Merás<sup>a</sup>,  
A. Jiménez Girón<sup>a</sup>, H.C. Goicoechea<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Department of Analytical Chemistry, University of Extremadura, 06071 Badajoz, Spain

<sup>b</sup> Laboratorio de Desarrollo Analítico y Quimiometría (LADAQ), Cátedra Química Analítica I, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, S3000ZAA Santa Fe, Argentina

Received 28 September 2006; received in revised form 21 December 2006; accepted 9 January 2007

### Abstract

The combination of unfolded-partial least-squares (U-PLS) with a recently proposed separate procedure, known as residual trilinearization (RTL), has been successfully employed for four-way data calibration. The chemometric method employs the evolution of excitation–emission matrices (EEMs) with time, for the resolution of folic acid–methotrexate mixtures, in human serum samples. The fluorogenic products monitored correspond to the oxidation of the studied analytes with potassium permanganate, in slightly acidic medium. The reaction is developed in 7 min and followed using a fast-scanning spectrofluorimeter, capable of recording each complete EEM in 12 s. This allows the acquisition of 10 successive EEMs, at different reaction times, during the development of the oxidation reaction, given rise to the four-way data set employed. The procedure, which had been previously reported for urine determination, is extended to serum analysis in this work. The combination of U-PLS/RTL is providing enhanced predictive results in comparison with standard methods as PARAFAC and N-PLS, in the presence of human serum, where significant unexpected components and or inner filter effects may occur.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Four-way data; Unfolded-partial least-squares; Residual trilinearization; Folic acid; Methotrexate; Human serum

### 1. Introduction

Methotrexate (MTX, 2,4-diamine-*N*,10-methylpteroyl glutamic acid) is a drug included into the antineoplastic and antirheumatic therapeutic categories. It belongs to the antifolates family which produced the first striking, although temporary remission in leukemia and the first cure of a solid tumor, choriocarcinoma [1–5]. At low doses, it is also used in the treatment of psoriatic arthritis and rheumatoid arthritis. Although very effective, its use potentially may produce serious side effects including nausea, mouth ulcers, blood problems, liver cirrhosis, and hair loss. Prolonged treatment with MTX may also lead to folic acid deficiency. To reduce the risk of these side effects, without fear of interfering with its efficacy, a daily dose of folic

acid is recommended for those patients taking MTX on a regular weekly basis.

On the other hand, low levels of folic acid (FA, 4-(2-amino-4-hydroxypteridin-6-yl)methylamino-benzoyl-L-glutamic acid), may play a role in cancer development, particularly cancers of cervix, lung and colon [2]. It was found that patients who took folic acid supplements, along with the arthritis drug methotrexate, were less likely to have a malfunctioning liver and less side effects, than those taking just methotrexate [3–5].

In this context, Baker et al. have designed a nanoparticle drug that contains folic acid, methotrexate and fluorescein, with the object of increasing methotrexate antitumor activity and decreasing its toxicity, in the first in vivo study of the therapeutic effect of targeted drug–dendrimer conjugates [6].

The first studies about spectrofluorimetric methods based on oxidation of MTX to pteridine carboxylic, using permanganate, date from 1969 [7]. This reaction was applied to study plasma levels in cancer patients [8] and a kinetic method was

\* Corresponding author.

E-mail address: [arsenio@unex.es](mailto:arsenio@unex.es) (A. Muñoz de la Peña).

developed in our laboratory for its determination in human serum [9].

Its determination by HPLC with fluorimetric detection, also involves derivatization reactions, such as photo-oxidative irradiation at 254 nm in presence of hydrogen peroxide [10–13], oxidation with permanganate in slightly acid medium [14,15], and oxidative cleavage using hydrogen peroxide in presence of phosphate buffer [16–18] or cerium (IV) trihydroxyhydroperoxide [19,20]. Another possibility is the degradation reaction of MTX in acidic solution and the conversion in its degradation product 4-amino-4-deoxy-10-methylpteroic acid [21].

Folic acid itself has little native fluorescence but, by oxidation, it can be turned into a strongly fluorescent compound. Manual fluorimetric methods based on oxidation with permanganate [22] and hydrogen peroxide [23] have been reported. Flow-injection was also used for the oxidation of folic acid using a lead dioxide solid-phase reactor for on-line oxidation [24], or by photochemical reaction [25].

There are no reported methods for the simultaneous determination of both compounds in serum and the analytical methods proposed are mainly applied to urine samples. A simple procedure using capillary zone electrophoresis to determine methotrexate, folinic acid and folic acid in human urine has been developed [26]. In addition, a chromatographic and densitometric method for the determination of folic acid as impurity in methotrexate has been also proposed [27].

The availability of high-order instrumental data coupled to newly chemometric algorithms for data processing, is increasing the regular use of multi-way analysis for solving complex analytical problems. Multi-way data possess an interesting property: the second-order advantage [28]. This property describes the analysis in the presence of unexpected components. Second-order, i.e., matrix data for a given sample, can be produced in a variety of ways, among which one of the simpler is an excitation–emission fluorescence matrix (EEM). When a sample produces a data matrix (a second-order tensor), such as an EEM, the corresponding set obtained by ‘stacking’ the training matrices is a three-way array.

On the other hand, four-way arrays can be obtained by stacking three-way data obtained when the evolution of a kinetic reaction is followed recording EEMs. The latter data have scarcely been employed to date for developing analytical methodologies. The only reported applications are related to chlorophylls *a* and *b* [29], adrenaline and noradrenaline [30], benzo[*a*]anthracene, benzo[*k*]fluoranthene and dibenzo[*a,h*]anthracene [31], 2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-*para*-dioxin [32], methotrexate and leucovorin [33,34], folic acid and methotrexate [35] and femvalerate [36].

This kind of data has been usually processed by resorting to the well-known parallel factor analysis (PARAFAC) method [37]. Very recently, the combination of trilinear least-squares with residual trilinearization (TLLS/RTL) has also been proposed as a new algorithm for four-way data treatment, and shown to be useful for the analysis of complex samples [33,34]. Alternative methodologies based on the use of latent variables do also exist for processing four-way data, such as multi-way partial least-squares (N-PLS), and the unfolded

variant of PLS (U-PLS), both of them lacking the second-order advantage [38]. On the other hand, a lately variant, U-PLS coupled to RTL [34], appears to be more suitable than PARAFAC when analytes present strong overlapping with the serum signal or inner filter effects occur. This fact has been already demonstrated for second order data with the counterpart U-PLS residual bilinearization (RBL) approach [39,40].

The aim of the present report was to exploit the potentiality of U-PLS/RTL, as a multi-way modelling approach, for the simultaneous quantitation of MTX and FA in a complex biological sample (human serum), when no satisfactory results are obtained by application of PARAFAC or N-PLS modelling. It is interesting to note that this is the first time where U-PLS/RTL is demonstrated to perform better than PARAFAC or N-PLS in a real biological problem. To perform the determination, both analytes were converted into highly fluorescent compounds, by oxidation with potassium permanganate, and the time evolution of excitation–emission matrices (EEMs) was recorded in order to apply the third-order calibration method.

## 2. Experimental

### 2.1. Apparatus and software

Fluorescence spectral measurements were performed on a Varian Cary Eclipse fluorescence spectrophotometer, equipped with two Czerny–Turner monochromators and a xenon flash lamp, and connected to a PC microcomputer via an IEEE 488 (GPIB) serial interface. The Cary Eclipse software was used for data acquisition. Fluorescence measurements were recorded in a 10 mm quartz cell at 20 °C, by use of a thermostatic cell holder and a Selecta thermostatic bath.

All calculations were done using MatLab 5.3, using different routines and graphical interfaces: MVC3, an integrated MatLab toolbox for third-order calibration, developed by Olivieri [33], which allow to perform third-order calibration, with different methods, including PARAFAC [37], unfolded-PLS coupled to residual trilinearization (RTL) [34], N-PLS [38] and TLLS coupled to RTL [34].

### 2.2. Reagents

All experiments were performed with analytical reagent grade chemicals. Folic acid and methotrexate were obtained from Sigma. Ultra pure water was obtained from a Milli-Q system (Waters Millipore). Stock standard solutions of FA and MTX were prepared by dissolving 0.010 g of these compounds in 100 mL of alkalized ultra pure grade water. Exposure to direct sunlight was avoided. Working FA and MTX solutions of different concentrations were prepared by dilution of stock solutions with ultra pure water. Buffer solution (pH 3.4,  $C_t = 0.5$  M) was prepared from chloroacetic acid and sodium chloroacetate (Panreac). A  $4.2 \times 10^{-4}$  M  $\text{KMnO}_4$  (Panreac) stock solution was also prepared with ultra pure water.



### 2.3. Calibration and test sets

In this work, the method of external calibration was employed. For this purpose, a calibration set of 13 samples was constructed, using a central composite design combined with a three level full factorial design. The levels correspond to values in the range 0–1 mg L<sup>-1</sup> for FA and MTX. Reagents were mixed in the measuring cell, by pipetting an appropriate volume of FA and MTX solution, add deionised water, if necessary, to complete 1 mL, 1 mL of 0.12 M chloroacetic/chloroacetate buffer solution and 1 mL of 1.4 × 10<sup>-4</sup> M KMnO<sub>4</sub> solution. The instrument was set up as follows: monochromators band pass ex/em (nm/nm) = 5/10, detector voltage 550 V and 20 °C of temperature.

The time evolution of EEMs of these solutions was then recorded, and the obtained data were subjected to four-way analysis, as described later. EEMs were recorded at 6 nm intervals for excitation, and at 5 nm intervals for emission. The rapid-scanning instrument allows the acquisition of a complete EEM in 0.2 min at a wavelength scanning speed of 24,000 nm/min. Ten EEMs were obtained at intervals of 0.7 min. It should be noticed that, if reaction significantly evolves during spectral acquisition, the data sample would not be strictly trilinear. In our case, we did not find this problem to be important.

First, the EEMs were recorded in wide spectral excitation, from 200 to 400 nm, and emission ranges, from 350 to 600 nm, respectively, and show Rayleigh scattering and second harmonics from the diffraction grating. These wide ranges were optimized to avoid the Rayleigh scattering and diffraction grating harmonics. These latter signals are undesirable because they are not correlated with the target concentrations of the analytes studied. Therefore, for calibration and prediction purposes, the EEMs were subsequently recorded, as a function of time, in sensible restricted excitation, from 260 to 380 nm, and emission, from 400 to 510 nm, respectively.

#### 2.3.1. Serum samples

Volumes of 100 μL of serum samples (a pool of serum taken from healthy individuals, obtained from the Hospital Infanta Cristina, Badajoz, Spain) were centrifuged for 5 min. Then, 10 μL of the supernatant were placed in the quartz cell and spiked with concentrations of both analytes, selected a random from their corresponding calibration ranges and treated as described for the calibration set. The level of serum dilution implies that the present calibration scheme covers concentration ranges up to 300 mg L<sup>-1</sup> for FA and MTX, which are within the serum levels for MTX and FA treatment [41,42].

### 2.4. Theory

#### 2.4.1. U-PLS/RTL

The theory corresponding to the U-PLS algorithm, in combination with residual bilinearization (RBL) was recently published [43]. The U-PLS/RBL model constitutes a second-order multivariate calibration method capable of achieving the second-order advantage [43–45]. For four-way calibration, U-PLS, combined with residual trilinearization (RTL) constitutes

an extension of U-PLS/RBL one further dimension [34] and will be briefly described in this section. When using four-way data, in the U-PLS method, the original matrix data is transformed into uni-dimensional arrays (vectors) by concatenating (unfolding) the original three-dimensional information, and concentration information is first employed into the calibration step (without including data for the unknown sample) [46]. The *I* calibration third order array  $\mathbf{X}_{c,i}$  (size  $J \times K \times L$ , where *J*, *K* and *L* are the number of channels in each dimension) are vectorized (unfolded) and a usual U-PLS model is calibrated with these data and the vector of calibration concentrations  $\mathbf{y}$  ( $I \times 1$ , where *I* is the number of calibration samples). This provides a set of loadings  $\mathbf{P}$  and weight loadings  $\mathbf{W}$  (both of size  $JKL \times A$ , where *A* is the number of latent factors), as well as regression coefficients  $\mathbf{v}$  (size  $A \times 1$ ). The parameter *A* can be selected by techniques such as leave-one-out cross-validation [47]. If no unsuspected interferences occur in the test sample,  $\mathbf{v}$  can be employed to estimate the analyte concentration:

$$y_u = \mathbf{t}_u^T \mathbf{v} \quad (1)$$

where  $\mathbf{t}_u$  (size  $A \times 1$ ) is the test sample score, obtained by projection of the (unfolded) data for the test sample  $\mathbf{X}_u$  [ $\text{vec}(\mathbf{X}_u)$ , size  $(JKL \times 1)$ ] onto the space of the *A* latent factors:

$$\mathbf{t}_u = (\mathbf{W}^T \mathbf{P})^{-1} \mathbf{W}^T \text{vec}(\mathbf{X}_u) \quad (2)$$

When uncalibrated constituents occur in  $\mathbf{X}_u$ , then the sample scores given by Eq. (1) are not suitable for analyte prediction using Eq. (2). In this case, the residuals of the U-PLS prediction step will be abnormally large in comparison with the typical instrumental noise assessed by replicate measurements:

$$S_p = \frac{\|\text{vec}(\mathbf{E}_p)\|}{(JKL - A)^{1/2}} = \frac{\|\text{vec}(\mathbf{X}_u) - P(\mathbf{W}^T \mathbf{P})^{-1} \mathbf{W}^T \text{vec}(\mathbf{X}_u)\|}{(JKL - A)^{1/2}} \\ = \frac{\|\text{vec}(\mathbf{X}_u - \mathbf{P} \mathbf{t}_u)\|}{(JKL - A)^{1/2}} \quad (3)$$

where  $\|\cdot\|$  indicates the Euclidean norm, and  $JKL - A$  corresponds to the degree of freedom (number of variables minus number of adjustable parameters).

If interferent components occur in the test sample, the situation can be handled by a separate procedure called residual trilinearization, based on a Tucker3 decomposition, that models the interferent effects, as already described [34]. RTL aims at minimizing the norm of the residual vector  $\mathbf{e}_u$ , computed while fitting the sample data to the sum of the relevant contributions to the sample signal. For a single interferent the relevant expression is:

$$\text{vec}(\mathbf{X}_u) = \mathbf{P} \mathbf{t}_u + g_{\text{int}}(\mathbf{d}_{\text{int}} \otimes \mathbf{c}_{\text{int}} \otimes \mathbf{b}_{\text{int}}) + \mathbf{e}_u \quad (4)$$

where  $\mathbf{b}_{\text{int}}$ ,  $\mathbf{c}_{\text{int}}$  and  $\mathbf{d}_{\text{int}}$  are normalized profiles in the three modes for the interference and  $g_{\text{int}}$  is the first core element obtained for Tucker3 analysis of  $\mathbf{E}_p$  in the following way:

$$(g_{\text{int}}, \mathbf{b}_{\text{int}}, \mathbf{c}_{\text{int}}, \mathbf{d}_{\text{int}}) = \text{Tucker3}(\mathbf{E}_p) \quad (5)$$

During this RTL procedure,  $\mathbf{P}$  is kept constant at the calibration values and  $\mathbf{t}_u$  is varied until  $\|\mathbf{e}_u\|$  is minimized. The

minimization can be carried out using either a Gauss–Newton (GN) procedure or an alternating least squares algorithm, in both cases starting with  $\mathbf{t}_u$  from Eq. (2). Once  $\|\mathbf{e}_u\|$  is minimized in Eq. (4), the analyte concentrations are provided by Eq. (1), by introducing the final  $\mathbf{t}_u$  vector found by the RTL procedure.

The number of interferents  $N_i$  can be assessed by comparing the final residuals  $s_u$  with the instrumental noise level:

$$s_u = \frac{\|\mathbf{e}_u\|}{[JKL - (N_c + N_i)]^{1/2}} \quad (6)$$

where  $\mathbf{e}_u$  is from Eq. (4) and  $N_c$  is the number of calibrated analytes. Typically, a plot of  $s_u$  computed for trial number of components will show decreasing values, starting at  $s_p$  when the number of components is equal to  $A$  (the number of latent variables used to described the calibration data), until it stabilizes at a value compatible with the experimental noise, allowing to locate the correct number of components.

#### 2.4.2. PARAFAC

The  $I$  calibration third order array  $\mathbf{X}_{c,i}$  (size  $J \times K \times L$ ) can be joined with the unknown sample array  $\mathbf{X}_u$  into a four-way data array  $\mathbf{X}$ , whose dimensions are  $[(I_{cal} + 1) \times J \times K \times L]$ . In the PARAFAC model, a generic element  $X_{ijk}$  of the four-dimensional array  $\mathbf{X}$  can be written as follows [37]:

$$X_{ijk} = \sum_{n=1}^N a_{in} b_{nj} c_{nk} d_{nl} + E_{ijkl} \quad (7)$$

where  $N$  is the total number of responsive components,  $E_{ijkl}$  an element of a residual error array  $\mathbf{E}$  of the same dimensions as  $\mathbf{X}$ ,  $a_{ni}$ ,  $b_{nj}$ ,  $c_{nk}$  and  $d_{nl}$  are the elements of the column vectors  $\mathbf{a}_n$ ,  $\mathbf{b}_n$ ,  $\mathbf{c}_n$  and  $\mathbf{d}_n$ , which are the relative concentration  $[(I + 1) \times 1]$ , emission  $(J \times 1)$ , excitation  $(K \times 1)$  and time channel  $(L \times 1)$  profiles for component  $n$ , respectively. The column vectors  $\mathbf{a}_n$ ,  $\mathbf{b}_n$ ,  $\mathbf{c}_n$  and  $\mathbf{d}_n$  are collected into the four loading matrices  $\mathbf{A}$ – $\mathbf{D}$  ( $\mathbf{b}_n$ ,  $\mathbf{c}_n$  and  $\mathbf{d}_n$  are usually normalized to unit length). Decomposition of the four-way array provides the profiles  $\mathbf{B}$ – $\mathbf{D}$ , corresponding to the emission and excitation wavelengths, the time channel, and the relative concentrations ( $\mathbf{A}$ ) of individual components in the  $(I + 1)$  mixtures, whether they are chemically known or not, comprising the basis of the so-called second-order advantage.

To estimate the number of responsive components ( $N$ ), the consideration of the PARAFAC internal parameter known as core consistency [48] is a useful technique. The parameter known as Concordia (%) is obtained through the following equation:

$$C(\%) = 100\% \times \left( 1 - \frac{\sum_{d=1}^N \sum_{e=1}^N \sum_{f=1}^N (g_{def} - t_{def})^2}{\sum_{d=1}^N \sum_{e=1}^N \sum_{f=1}^N t_{def}^2} \right) \quad (8)$$

where  $g_{def}$  and  $t_{def}$  are the elements of the calculated core and of the intrinsic super-diagonal core, respectively, and  $N$  is the number of components of the model, defined by dimensions  $(d \times e \times f)$ . If they are equal, the core consistency is perfect and has a value of unity (100%). The appropriate number of components is accessed by the model with the highest number of

components and a valid value of core consistency diagnostic test.

In the present case, the number of components is equal to the number of different species in the sample. For binary mixture standards, this number is 2, while for serum samples spiked with the analytes this number reaches 3 or 4 on account of the presence of the two analytes plus the background signal originated by serum components (presence of unexpected components).

Identification of the chemical constituent under investigation is done with the aid of the profiles  $\mathbf{B}$ – $\mathbf{D}$ , as extracted by PARAFAC, and comparing them with those for a standard solution of the analyte of interest. On the other hand, absolute analyte concentrations are obtained after proper calibration, since only relative values ( $\mathbf{A}$ ) are provided by decomposing the three-way data array. Experimentally, this is done by using the information for the set of standards of known composition. The calibration procedure involves decomposing an array formed by joining the matrices for the  $I$  training samples with that for the unknown. Resorting to Eq. (7), once the component profiles have been obtained, the scores for the standard samples associated with a particular component are linearly related to the nominal concentrations of the analyte:

$$[a_{n1}|a_{n2}|\dots|a_{nI}] = k_{\text{PARAFAC}} \mathbf{y} \quad (9)$$

where  $n$  identifies a PARAFAC component, and  $\mathbf{y}$  is an  $I \times 1$  vector holding the nominal analyte concentrations in the  $I$  calibration standards. It should be noticed that employment of this joined calibration mode implies that the array decomposition should be repeated for each newly analyzed sample.

#### 2.4.3. N-PLS

Multiway regression methods such as N-PLS extend the traditional PLS algorithm to higher orders, using the multidimensional structure of the data for model building and prediction [38]. In the case of four-way data, the model is given by the following equation:

$$x_{ijkl} = \sum_{f=1}^F t_{if} w_{jf}^J w_{kf}^K w_{lf}^L + e_{ijkl} \quad (10)$$

where  $x_{ijkl}$  is the fluorescence intensity measured for sample  $i$  at emission wavelength  $j$  and excitation wavelength  $k$  and time  $l$ . The scalar  $F$  is the number of components,  $t_{if}$  is an element of the score matrix  $\mathbf{T}$ ,  $w_{jf}^J$ ,  $w_{kf}^K$  and  $w_{lf}^L$  are elements of three  $\mathbf{W}$  loading matrices, and  $e_{ijkl}$  is a residue not fitted by the model. The model finds the scores yielding maximum covariance with analyte concentrations as the dependent variable, in a four-dimensional sense. The advantage of using N-PLS is a stabilization of the decomposition involved in Eq. (10), which potentially gives increased interpretability and better predictions. However, this methodology does not exploit the second-order advantage, and in principle, it should lead to results of a lower quality as compared to PARAFAC or U-PLS/RTL in samples of complex composition like the analyzed in the present work.

#### 2.4.4. Figures of merit

Figures of merit are analytical parameters used for the comparison of methods. In order to calculate the sensitivity, Eq. (11) was applied to a similar case than the one studied herein [33]:

$$\text{SEN} = k \{ [(\mathbf{B}^T \mathbf{B}) * (\mathbf{C}^T \mathbf{C}) * (\mathbf{D}^T \mathbf{D})]_{nn} \}^{-1/2} \quad (11)$$

where “\*” is the element-wise product operator and  $k$  is an appropriate scaling actor. In PARAFAC,  $k$  is identified with the proportionality constant between scores and concentrations (Eq. (9)), while in U-PLS/RBL it can be obtained by regressing the  $g_{\text{int}}$  values (Eq. (4)) against  $\mathbf{y}$ . Note that when serum is included in the samples,  $\mathbf{B}$ – $\mathbf{D}$  include interference profiles and hence a decrease in sensitivity is expected. When the second-order advantage is achieved, Eq. (11) implies a SEN value that is sample-specific and that cannot be defined for the multivariate method as a whole. We thus report average values for a set of representative samples.

On the other hand, the LOD can be estimated using the expression [33]:

$$\text{LOD} = \frac{3.3s_r}{\text{SEN}} \quad (12)$$

where  $s_r$  is the instrumental noise level and the appropriate SEN value is employed. Eq. (12) does not account for calibration uncertainties, and hence, it generally provides overoptimistic values. In the case of serum samples, because the value of SEN is given as an average value over a test sample set, LOD is also reported as an average figure.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Fluorimetric kinetics study of the analytes

FA and MTX are weakly fluorescent compounds but their oxidation, in presence of potassium permanganate, generated two products which are strongly fluorescent. The instrumental and experimental parameters of the corresponding oxidation reactions were already studied and optimized, in order to obtain the appropriate kinetics and fluorescence properties of the products originated. Wittle et al. [49] described how permanganate oxidation of folic acid gives rise to two main fragments, a strongly fluorescent substance identified as 2-amino-4-hydroxy-pteridine-6-carboxylic acid and a second, non-pteridine component. The excitation and emission spectra of the oxidation products, in presence of potassium permanganate, obtained at 7 min of reaction time, show maxima at 350 and 336 nm, for excitation and at 446 and 469 nm, for emission, for FA and MTX, respectively [35]. A strong overlap between their fluorescence spectra can be noted.

As already stated, the determination of mixtures of FA and MTX in urine samples has been previously proposed [35]. First-, second- and third-order methods were investigated and, owing to the complexity of the problem to be solved, third-order calibration was necessary to resolve the mixture. The four-way data used were obtained by recording the evolution with the time of EEM fluorescence measurements, and four-way parallel factor

analysis (PARAFAC) or multi-way partial least squares (N-PLS) chemometric calibration.

The proposed method of determination, of mixtures of FA and MTX, was performed at pH 3.4, using a 0.04 mol L<sup>-1</sup> chloroacetic/sodium chloroacetate buffer solution, and KMnO<sub>4</sub> 1.4 × 10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup>, at 20 °C [35].

The four-way data used were obtained by recording the evolution with the time of EEM fluorescence measurements, and four-way parallel factor analysis (PARAFAC) and multi-way partial least squares (N-PLS) chemometric calibration were applied satisfactorily, in urine samples. No significant differences were found using the two approaches in this particular case.

It is necessary to remark that, in Ref. [35], the proposed method was applied to urine samples and, in this manuscript, the method was applied to serum samples. As serum background is more complex than urine background and significant unexpected components and or inner filter effects may occur, PARAFAC and N-PLS fail in given adequate prediction results. This is different to the case of urine samples, where the above mentioned methods work properly. This was the reason of investigating in this work a new approach, U-PLS in combination with RTL that has demonstrated its utility in similar situations [39,40].

#### 3.2. Third-order calibration methods

Fig. 1 shows the four-way data array structure used in this work, following the time evolution of the EEM of one of the calibration mixtures, in the presence of potassium permanganate. It can be appreciated that the fluorescence intensity of the analytes increases considerably as a function of reaction time. This provided sensitivity for the determination which is significantly larger than that achieved in the absence of oxidant.

Taking into account the results previously found, we should use the four-way data, following the evolution with time of the EEM of binary mixtures of MTX and FA, for the determination of the analytes in serum samples. The ranges selected were 420–505 nm for emission, 266–374 nm for excitation and 0–5 min for time, for FA and, 455–510 nm for emission, 302–362 nm for excitation and 0–5 min for time, for MTX. The investigated calibration methods were N-PLS, PARAFAC and U-PLS/RTL, a new methodology, recently proposed [34], which applications are practically unexplored.

Fig. 2 shows the experimental design composed of 13 calibration samples, using a central composite design combined with a three level full factorial design, used to generate the data array. The serum samples test set was generated using a random design, i.e., selecting the target concentrations of both analytes at random from the calibration range of each analyte (see Table 1 for details on the composition of these samples).

The number of latent variables was established in N-PLS by resorting to the well-known cross-validation leave-one-sample-out procedure, according to the criterion of Haaland and Thomas [47]. The optimum number of factors was estimated by calculating the ratios  $F(A) = \text{PRESS}(A < A^*) / \text{PRESS}(A)$  (where  $\text{PRESS} = \sum (C_{i,\text{act}} - C_{i,\text{pred}})^2$ ,  $A$  is a trial number of factors and  $A^*$  corresponds to the minimum PRESS) and selecting the num-

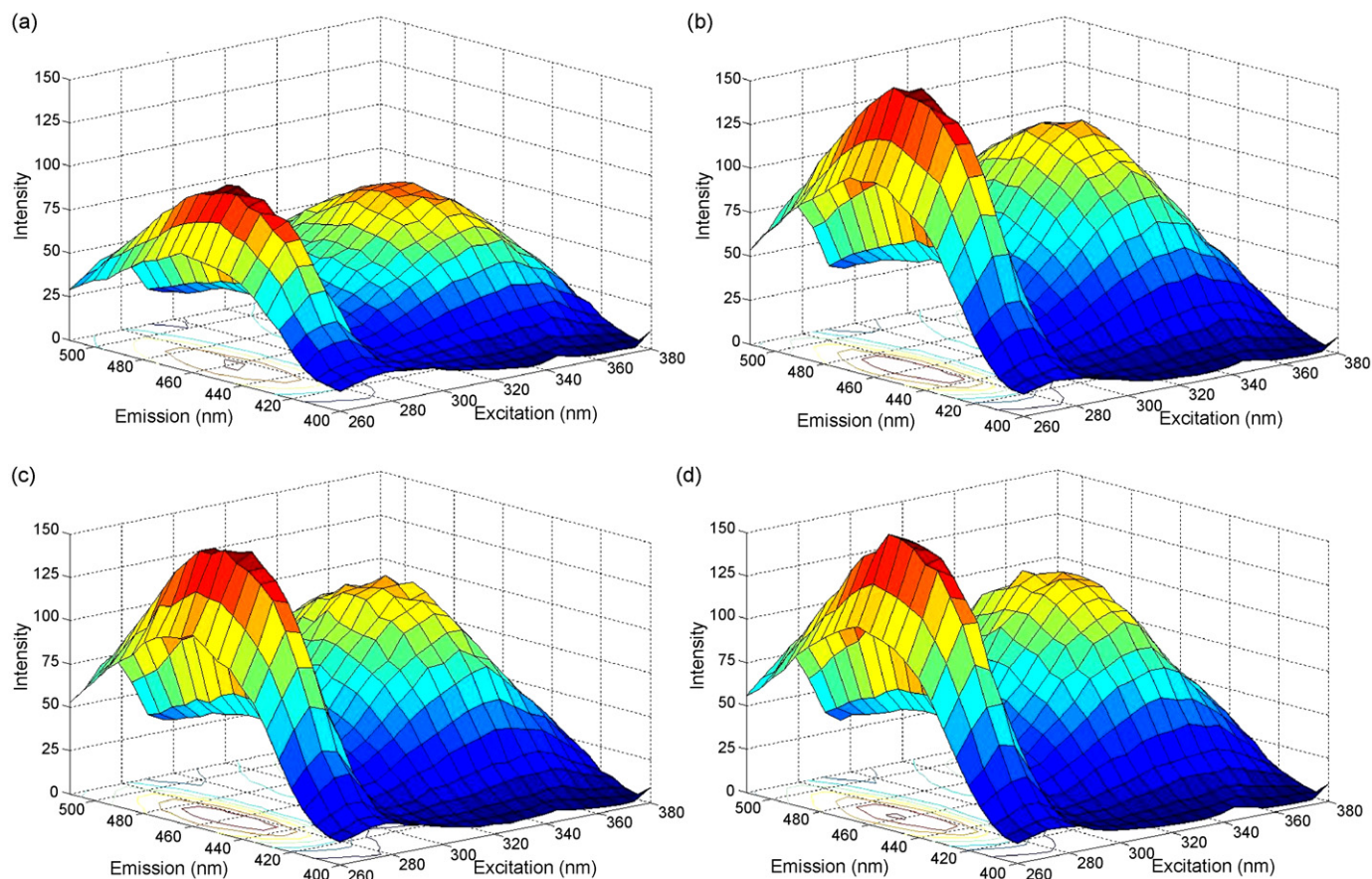


Fig. 1. Excitation–emission matrices (EEMs) for an aqueous solution (pH 3.4) containing  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  FA and  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  MTX, as a function of the time of permanganate oxidation. Time selected for illustrating the kinetic evolution of the EEMs (in min): (a) 0, (b) 2.1, (c) 4.2 and (d) 6.3.

ber of factors leading to a probability of less than 75% that  $F > 1$ . This analysis led to the conclusion that the later number was 2 for both calibration models corresponding to each analyte. On the other hand, the core consistency analysis (see above) was applied for selecting the number of spectral components in PARAFAC

[49]. This latter test allowed us to find the optimum number of factors to be used when predicting the analytes concentration in both validation and test samples. Interestingly, for the calibration set, which was prepared with pure standard mixtures, the number of factors was 2, while this number reached 3 or 4 for those samples prepared by spiking real serum. This explains that unexpected components are present in the latter samples. However, unsatisfactory results were obtained from this complicated mixture by PARAFAC or N-PLS (relative error of prediction values higher than 30%). These results are quite different to those obtained when analysing this mixture in synthetic samples (REP = 4–8%), although REP values among 9–23% were found in urine samples [35].

Afterwards, U-PLS/RTL was applied in order to evaluate if an improvement of the results can be obtained respect to PARAFAC and N-PLS. When U-PLS was applied, two latent variables were estimated by means of cross validation [47], fact that agrees well with the number of factors for N-PLS analysis. Subsequently, two additional components were necessary to consider in the RTL procedure when the test set was analysed, suggesting two unexpected components in the serum samples. Fig. 3 shows the variation of prediction residuals ( $s_u$ ) as a function of trial values of the number of interferences ( $N_i$ ). The plot shows that when the analysed sample is one corresponding to the test set (sample #2), the necessary number of

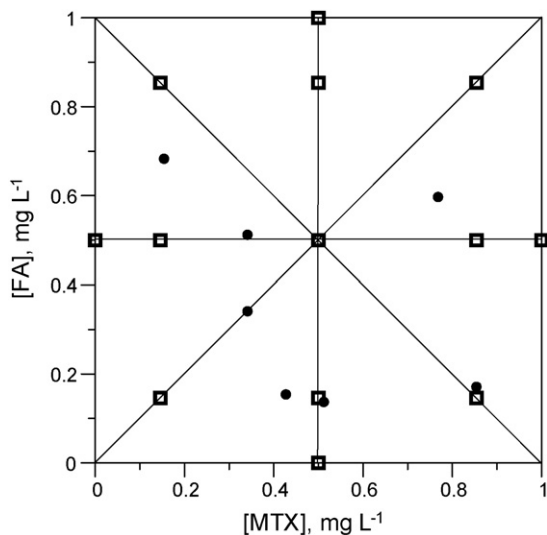


Fig. 2. Experimental design used in the studies of MTX and FA mixtures. (■) Calibration set and (●) serum test set.

Table 1  
Results obtained when applying U-PLS/RTL in the analysis of serum samples

FA			MTX		
Actual (mg L <sup>-1</sup> )	Predicted (mg L <sup>-1</sup> )	Rec. (%)	Actual (mg L <sup>-1</sup> )	Predicted (mg L <sup>-1</sup> )	Rec. (%)
0.51	0.56	110	0.34	0.30	88
0.34	0.33	97	0.34	0.36	106
0.68	0.52	76	0.15	0.18	120
0.00	–	–	0.96	1.10	115
0.99	0.86	87	0.00	–	–
0.43	0.45	81	0.84	0.88	105
0.68	0.71	104	0.71	0.67	94
Av. Rec. <sup>a</sup> (%)		93 (13)	Av. Rec. <sup>a</sup> (%)		105 (12)
REP <sup>b</sup> (%)		12	REP <sup>b</sup> (%)		11

<sup>a</sup> Average recovery. Values between parentheses correspond to the standard deviations computed for the recoveries of the seven serum samples.

<sup>b</sup> REP (%): relative error of prediction.

factors for interferences ( $N_i$ ) reaches 2. As can be seen, this model shows a prediction residual comparable to the instrumental noise level (ca. 1.5 fluorescence units). Predictions using the U-PLS/RTL model are collected in Table 1. As regard the figures of merit for the proposed methodology, LODs were calculated as average values (see above) for a set of representative samples. The obtained values are the following: FA, 0.014 mg L<sup>-1</sup> and MTX, 0.085 mg L<sup>-1</sup>. Also, the lineal range was studied and it was found from 0 to 10 mg L<sup>-1</sup> for FA and to 4 mg L<sup>-1</sup> for MTX.

In order to get further insight into the accuracy and precision of the algorithm analysed, nominal versus found concentration values were compared by application of the EJCR test. This approach based on the bivariate least squares (BLS) calibration method, computes the joint confidence interval for the intercept and the slope [50,51]. The estimated intercept and slope ( $\hat{a}$  and  $\hat{b}$ , respectively) were compared with their ideal values of 0 and 1 using the elliptical joint confidence region test [52]. Fig. 4 shows the EJCR plots for FA and MTX analysis. As can be seen, the ellipses contain the theoretical ( $a=0$  and  $b=1$ )

point, what means that no significant differences were found for the confidence level proposed (95%). When U-PLS/RTL was applied, all predictions are seen to be reasonable for samples of the complexity of human serum.

The improved analytical results of U-PLS/RTL over the classical PARAFAC and N-PLS models could probably be understood considering that U-PLS takes better account of the analyte-background interactions due to its latent variable properties. On the other hand, N-PLS does not resort to the second order advantage, as was previously mentioned. Similar results have been already reported in the analysis of complex biological samples, for second order data, in the cases where matrix interferences and/or inner filter effects occur [39,40,53].

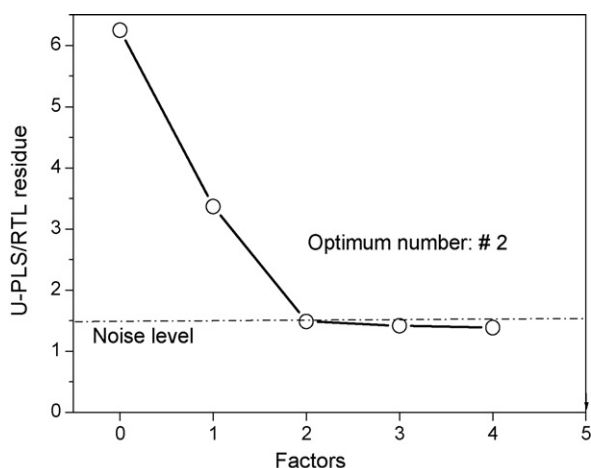


Fig. 3. Plot of the prediction residuals ( $s_u$ ) a function of a trial number of interferent components ( $N_i$ ) for serum sample 2, containing 0.34 mg L<sup>-1</sup> FA and 0.34 mg L<sup>-1</sup> MTX concentrations. The noise level in this system is ca. 1.5 fluorescence intensity units (-----).

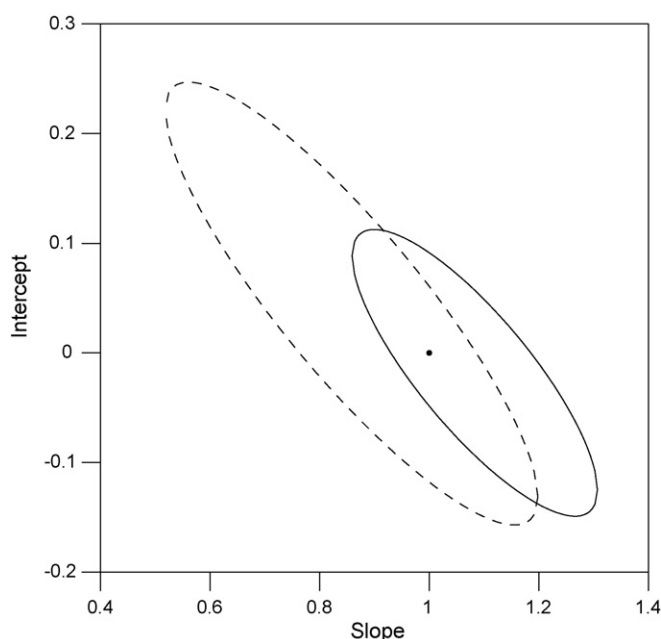


Fig. 4. Plots of the elliptical joint regions (at 95% confidence level), for the slope and intercept, of the least squares regression of the FA (—) and MTX (---) plots, of concentrations predicted by the U-PLS/RBL model, in the serum sample set, as a function of the corresponding nominal values. The black point marks the theoretical (1, 0) point.

#### 4. Conclusions

Different multi-way calibration methods have been employed in order to solve methotrexate and folic acid mixtures in a complex biological sample, in which the fluorescence spectra of the mixture components are highly overlapped. Third-order calibration methods were necessary for the determination of these analytes in serum samples and, due to the complexity of the matrix background, only the U-PLS/RTL method was capable to resolve the problem, obtaining satisfactory results. The use of four-way arrays of data exploiting the information contained in a full fluorescence EEM spectrum, in combination with kinetic methods, is a promising tool for complex multicomponent analysis. The time-dependent formation of fluorescent products, by permanganate oxidation, provides an additional order of selectivity with which to determine the analytes of interest. The calibration by U-PLS, including additional latent variables in the model, in combination with RTL, achieving the second-order advantage, considerably improved the analytical results, allowing the folic acid and methotrexate calibration in serum samples.

#### Acknowledgements

Financial support from the Ministerio de Educación y Ciencia of Spain (Project CTQ 2005-02389) is acknowledged. HCG thanks Universidad Nacional del Litoral (Project CAI+D No. 4-30) and CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas) for financial support.

#### References

- [1] J.R. Bertino, *J. Clin. Oncol.* 11 (1993) 5–14.
- [2] Cancers, Nutrition, Food, World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research, Washington, DC, 1997.
- [3] G.K. Endresen, G. Husby, *Tidsskr Nor Laegeforen* 119 (1999) 534–537.
- [4] Z. Ortiz, B. Shea, M.E. Suarez-Almazor, D. Moher, G.A. Wells, P. Tugwell, *J. Rheumatol.* 25 (1998) 36–43.
- [5] O.K. Jensen, C. Rasmussen, F. Mollerup, P.B. Christensen, H. Hansen, S. Ekelund, A.M. Thulstrup, *J. Rheumatol.* 29 (2002) 1615–1618.
- [6] J.F. Kukowska-Latallo, K.A. Candido, Z. Cao, S.S. Nigavekar, I.J. Majoros, T.P. Thomas, L.P. Balogh, M.K. Khan, J.R. Baker Jr., *Cancer Res.* 65 (2005) 5317–5324.
- [7] S.G. Chakrabarti, I.A. Bernstein, *Clin. Chem.* 15 (1969) 1157–1161.
- [8] J.M.J. Kinkade, W.R. Vogler, P.G. Dayton, *Biochem. Med.* 10 (1974) 337–350.
- [9] A. Espinosa-Mansilla, I. Durán Merás, A. Zamoro, L. Pedano, C. Ferreyra, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 29 (2002) 851–858.
- [10] Z. Yu, D. Westerlund, K.S. Boos, *J. Chromatogr.: Biomed. Appl.* 689 (1997) 379–386.
- [11] O. Beck, P. Seideman, M. Wennberg, C. Peterson, *Ther. Drug Monit.* 13 (1991) 528–532.
- [12] J. Salamoun, M. Smrz, F. Kiss, A. Salamounova, *J. Chromatogr.: Biomed. Appl.* 419 (1987) 213–223.
- [13] J. Salamoun, J. Frantisek, *J. Chromatogr.: Biomed. Appl.* 378 (1986) 173–181.
- [14] T. Suzuki, H. Hashimoto, N. Ichinose, *Fresen. J. Anal. Chem.* 351 (1995) 806–807.
- [15] I. Durán Merás, A. Espinosa Mansilla, M.J. Rodríguez Gómez, *Anal. Biochem.* 346 (2005) 201–209.
- [16] E.A. McCrudden, S.E. Tett, *J. Chromatogr.: Biomed. Appl.* 721 (1999) 87–92.
- [17] F. Albertioni, C. Rask, S. Eksborg, J.H. Poulsen, B. Pettersson, O. Beck, H. Schroeder, C. Peterson, *Clin. Chem.* 42 (1996) 39–44.
- [18] F. Albertioni, B. Pettersson, O. Beck, C. Rask, P. Seideman, C. Peterson, *J. Chromatogr.: Biomed. Appl.* 665 (1995) 163–170.
- [19] S. Emará, S. Razee, A. Khedr, T. Masujima, *Biomed. Chromatogr.* 11 (1997) 42–46.
- [20] S. Emará, H. Askal, T. Masujima, *Biomed. Chromatogr.* 12 (1998) 338–342.
- [21] S.M. Sabry, M. Abdel-Hady, M. Elsayed, O.T. Fahmy, H.M. Maher, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 32 (2003) 409–423.
- [22] N. Ichinose, T. Tsuneyoshi, M. Kato, T. Sukuzi, S. Ikeda, *Fresen. J. Anal. Chem.* 346 (1993) 841–846.
- [23] X. Liu, H.G. Huang, *Fenxi-Huaxue, Chin. J. Anal. Chem.* 30 (2002) 1018.
- [24] Z.Q. Zhang, Y. Tang, *Anal. Bioanal. Chem.* 381 (2005) 932–936.
- [25] R.A.S. Lapa, J.L.F.C. Lima, B.F. Reis, J.L.M. Santos, E.A.G. Zagatto, *Anal. Chim. Acta* 351 (1997) 223–228.
- [26] J. Rodríguez Flores, G. Castañeda Peñalvo, A. Espinosa Mansilla, M.J. Rodríguez Gómez, *J. Chromatogr. B* 819 (2005) 141–147.
- [27] J. Krzek, A. Kwiecien, *Chem. Anal.* 45 (2000) 551–559.
- [28] K.S. Booksh, B.R. Kowalski, *Anal. Chem.* 66 (1994) 782A.
- [29] Y. Tan, J.H. Jiang, H.L. Wu, H. Cui, R.Q. Yu, *Anal. Chim. Acta* 412 (2000) 2798–2806.
- [30] R.P.H. Nikolajsen, K.S. Booksh, A.M. Hansen, R. Bro, *Anal. Chim. Acta* 475 (2003) 137–150.
- [31] Y.C. Kim, J.A. Jordan, M.L. Nahorniak, K.S. Booksh, *Anal. Chem.* 77 (2005) 7679–7686.
- [32] H.C. Goicoechea, S. Yu, A.C. Olivieri, A.C. Campiglia, *Anal. Chem.* 77 (2005) 2608–2616.
- [33] A.C. Olivieri, J.A. Arancibia, A. Muñoz de la Peña, I. Durán Merás, A. Espinosa Mansilla, *Anal. Chem.* 76 (2004) 5657–5666.
- [34] J.A. Arancibia, A.C. Olivieri, D. Bohoyo Gil, A. Espinosa Mansilla, I. Durán-Merás, A. Muñoz de la Peña, *Chemom. Intell. Laborat. Syst.* 80 (2006) 77–86.
- [35] A. Muñoz de la Peña, I. Durán Merás, A. Jiménez Girón, *Anal. Bioanal. Chem.* 385 (2006) 1289–1297.
- [36] M.L. Nahorniak, G.A. Cooper, Y.-C. Kim, K.S. Booksh, *Analyst* 130 (2005) 85–93.
- [37] C.M. Andersen, R. Bro, *J. Chemom.* 17 (2003) 200–215.
- [38] R. Bro, *J. Chemom.* 10 (1996) 47–61.
- [39] M.J. Culzoni, H.C. Goicoechea, A.P. Pagani, M.A. Cabezon, A.C. Olivieri, *Analyst* 131 (2006) 718–723.
- [40] G.N. Piccirilli, G.M. Escandar, *Analyst* 131 (2006) 1012–1020.
- [41] A. Espinosa Mansilla, I. Durán Merás, M.J. Rodríguez Gómez, A. Muñoz de la Peña, F. Salinas, *Talanta* 58 (2002) 255–263.
- [42] S.L. Morgan, J.Y. Lee, G.S. Alarcon, *Ann. Int. Med.* 124 (1996) 74.
- [43] A.C. Olivieri, *J. Chemom.* 19 (2005) 253–265.
- [44] J. Øhman, P. Geladi, S. Wold, *J. Chemom.* 4 (1990) 79–90.
- [45] J. Øhman, P. Geladi, S. Wold, *J. Chemom.* 4 (1990) 135–146.
- [46] S. Wold, P. Geladi, K. Esbensen, J. Øhman, *J. Chemom.* 1 (1987) 41–56.
- [47] D.M. Haaland, E.V. Thomas, *Anal. Chem.* 60 (1988) 1193–1202.
- [48] R. Bro, H.A.L. Kiers, *J. Chemom.* 17 (2003) 274–286.
- [49] E.L. Wittle, B.L. O'Dell, J.M. Vandenberg, J.J. Piffner, *J. Am. Chem. Soc.* 69 (1947) 1786–1792.
- [50] J. Riu, F.X. Rius, *Trends Anal. Chem.* 16 (1997) 211–216.
- [51] F.J. del Río, J. Riu, F.X. Rius, *Anal. Chim. Acta* 446 (2001) 49–58.
- [52] A.V. González, M.A. Herrador, A.G. Asuero, *Talanta* 48 (1999) 729–736.
- [53] D. Bohoyo Gil, A. Muñoz de la Peña, J.A. Arancibia, G.M. Escandar, A.C. Olivieri, *Anal. Chem.* 78 (2006) 8051–8058.



Analytical Chemistry, (2007) Enviado

**Multi-way partial least-squares coupled to residual trilinearitation: a genuine multi-dimensional tool for the study of third-order data. Simultaneous analysis of procaine and *p*-amine benzoic acid in equine serum**





**Multi-way partial least-squares coupled to residual trilinearization: a genuine multi-dimensional tool for the study of third-order data. Simultaneous analysis of procaine and its metabolite *p*-amino benzoic acid in equine serum.**

Patricia C. Damiani,<sup>‡</sup> Isabel Durán-Merás,<sup>†</sup> Alejandro García-Reiriz,<sup>‡</sup> Ana Jiménez-Girón,<sup>†</sup> Arsenio Muñoz de la Peña<sup>†</sup> and Alejandro C. Olivieri<sup>\*:‡</sup>

*Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias, Universidad de Extremadura (06071) Badajoz, Spain, and Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, Suipacha 531, Rosario (S2002LRK), Argentina*

**A new third-order multivariate calibration approach, based on the combination of multiway-partial least-squares with a separate procedure called residual trilinearization (N-PLS/RTL), is presented and applied to multicomponent analysis using third-order data. The proposed chemometric algorithm is able to predict analyte concentrations in the presence of unexpected sample components, which require strict adherence to the second-order advantage. Results for the determination of procaine and its metabolite *p*-amino benzoic acid in equine serum are discussed, based on kinetic fluorescence excitation-emission four-way measurements, and application of the newly developed multi-way methodology. Since the analytes are also the reagent and product of the hydrolysis reaction followed by fast-scanning fluorescence spectroscopy, the classical approach based on parallel factor analysis (PARAFAC) is challenged by strong linear dependencies and multilinearity losses. In comparison, N-PLS/RTL appears an appealing genuine multi-way alternative which avoids the latter complications, yielding analytical results which are statistically comparable to those rendered by related unfolded algorithms which are also able to process four-way data. Prediction was made on validation samples with a qualitative composition similar to the calibration set, and also on test samples containing unexpected equine serum components.**

*Keywords:* Four-way data; Second-order advantage; Multiway partial least-squares; Residual trilinearization; Procaine; *p*-Amino benzoic acid; Equine serum

---

\* To whom correspondence should be addressed. E-mail: aolivier@fbioyf.unr.edu.ar.

<sup>†</sup> Universidad de Extremadura.

<sup>‡</sup> Universidad Nacional de Rosario.

Owing to its intrinsic sensitivity, easiness of use and availability of instruments, fluorescence spectroscopy provides a valuable tool to analytical chemists.<sup>1</sup> When a given sample carries unexpected fluorescent constituents which have not been modelled during the calibration phase, a convenient way of quantifying a given analyte is by resorting to higher order data coupled to the second-order advantage.<sup>2</sup> Examples on the use of second-order spectrofluorimetry to analyze complex samples can be found in recent reports.<sup>3,4</sup> However, very few works have been published based on third-order data. Specifically, they describe the processing of time-modulated luminescence excitation-emission matrices (EEM), either by following the kinetics of a reaction using spectrofluorimetry<sup>5-11</sup> or the time resolved decay of phosphorescence signals.<sup>12</sup> A recent publication deals with two-dimensional liquid chromatography coupled to diode array detection (LC-LC-DAD) for metabolomic studies.<sup>13</sup>

The classical multi-way multivariate algorithm parallel factor analysis (PARAFAC)<sup>14</sup> is able of processing second- and higher-order data and obtaining the second-order advantage. The success of PARAFAC in this regard is directly related to the trilinearity in the processed data: fluorescence EEMs are not merely a collection of two-way data sets, but there is actually an internal relationship between each of the matrices and, as a consequence, the decomposition of the data array built with the response matrices measured for a number of samples is often unique. If a unique decomposition is achieved, the second order advantage can be obtained, allowing a robust estimation of analyte concentrations in mixtures, even in the presence of unknown interferences.

Recently, alternatives based on data unfolding, such as trilinear least-squares (TLLS)<sup>15</sup> and unfolded-partial least-squares (U-PLS),<sup>16</sup> have been introduced, which deal with this information by concatenating (or unfolding) the original data into uni-dimensional arrays (vectors). In the presence of unexpected compounds of unknown origin, TLLS and U-PLS should be complemented with an additional procedure to achieve the second-order advantage. A technique which is useful in this regard, called residual trilinearization (RTL), has been developed by our group as an extension of residual bilinearization (RBL),<sup>17,18</sup> which was originally proposed for second-order data.<sup>15</sup> Latent structured methods such as U-PLS/RBL are particularly interesting, especially because recent applications in the second-order domain have highlighted its abilities in modelling non-trilinear data sets, when compared to the more classical PARAFAC and bilinear least-squares/RBL (BLLS/RBL).<sup>19-21</sup>

However, it appears that a genuine multi-way latent variable method capable of achieving the second-order advantage is still needed. We have recently combined multi-way PLS (N-PLS)<sup>22</sup> with RBL for three-way data, producing a technique which is still under testing in our laboratories, using both simulated and experimental second-order data sets. In the present report, where four-way kinetic fluorescence excitation-emission data are analyzed, we introduce the required combination of N-PLS with RTL for third-order data sets, extending the approach one further dimension. The aim is the simultaneous quantitation of the anaesthetic procaine and its metabolite *p*-amino benzoic acid in equine serum samples, where the background interference makes the use of the second-order advantage mandatory.

Procaine (PRO, 2-diethylaminoethyl *p*-aminobenzoate hydrochloride) is used as a local anaesthetics. In human plasma, it is almost completely hydrolyzed by the enzyme pseudocholinesterase to *p*-amino benzoic acid (PAB) and diethylaminoethanol.<sup>23</sup> The latter compound has both circulatory and neurological effects, producing blood vessel constriction and euphoria.<sup>24</sup> PRO is usually used in horses as anaesthetics, but also as stimulating drug in racing horses. Horse plasma does not promote the complete hydrolysis of PRO into PAB,<sup>25</sup> and therefore the simultaneous determination of both compounds is important in monitoring fair horse sports. Several analytical methods for the determination of either PRO or PAB in a variety of samples are known,<sup>26-34</sup> however, only few methods were developed for the

simultaneous determination of PRO and PAB, mainly based on high performance liquid chromatographic (HPLC) techniques.<sup>35-37</sup>

In this report, we follow the hydrolysis of PRO to give strongly fluorescent PAB in aqueous alkaline media,<sup>38</sup> by recording fluorescence excitation-emission matrices as a function of reaction time using a fast scanning detector, and processing the obtained four-way information with the classical PARAFAC model, as well as with the presently introduced multi-way latent structured method N-PLS/RTL and some of its unfolded predecessors. We also compare the advantages and disadvantages of the above mentioned chemometric techniques as regards the resolution of the presently studied multi-component mixtures.

## THEORY

**The N-PLS model.** In the N-PLS method applied to third-order data, concentration information is employed in the calibration step, without including data for the unknown sample. The  $I$  calibration data arrays, together with the vector of calibration concentrations  $\mathbf{y}$  (size  $I \times 1$ ) are employed to obtain sets of loadings  $\mathbf{W}^j$ ,  $\mathbf{W}^k$  and  $\mathbf{W}^l$  (of sizes  $J \times A$ ,  $K \times A$  and  $L \times A$ , where  $A$  is the number of latent factors), as well as regression coefficients  $\mathbf{b}$  (size  $A \times 1$ ).<sup>39</sup> The parameter  $A$  can be selected by techniques such as leave-one-out cross-validation.<sup>40</sup> If no unexpected components occurred in the test sample,  $\mathbf{b}$  could be employed to estimate the analyte concentration according to:

$$y_u = \mathbf{t}_u^T \mathbf{b} \quad (1)$$

where  $\mathbf{t}_u$  is the test sample score vector, obtained by appropriate projection of the test data onto the calibration loading matrices. When unexpected constituents occur in the unknown sample, then the latter scores are unsuitable for analyte prediction through equation (1). In this case, the residuals of the N-PLS prediction step [ $s_p$ , see equation (2) below] will be abnormally large in comparison with the typical instrumental noise level:

$$s_p = \|\mathbf{e}_p\| / (JKL-A)^{1/2} = \|\text{vec}(\mathbf{X}_u) - \text{vec}(\hat{\mathbf{X}}_u)\| / (JKL-A)^{1/2} \quad (2)$$

where  $\hat{\mathbf{X}}_u$  is the sample three-way data array ( $\mathbf{X}_u$ ) reconstructed by the N-PLS model and  $\|\cdot\|$  indicates the Euclidean norm.

This situation can be handled by a separate procedure called residual trilinearization, based on the Tucker3 model of the unexpected effects.<sup>8</sup> RTL aims at minimizing the residuals computed while fitting the sample data to the sum of the relevant contributions:

$$\mathbf{X}_u = \text{reshape}\{\mathbf{t}_u[(\mathbf{W}^j | \otimes | \mathbf{W}^k) | \otimes | \mathbf{W}^l]\} + \text{Tucker3}(\hat{\mathbf{X}}_u - \mathbf{X}_u) + \mathbf{E}_u \quad (3)$$

where 'reshape' indicates transforming a  $JKL \times 1$  vector into a  $J \times K \times L$  three-way array, and  $| \otimes |$  indicates the Kathri-Rao operator.<sup>39</sup> During this RTL procedure, the weight loadings  $\mathbf{W}^j$ ,  $\mathbf{W}^k$  and  $\mathbf{W}^l$  are kept constant at the calibration values, and  $\mathbf{t}_u$  is varied until the norm  $\|\mathbf{E}_u\|$  is minimized [see equation (3)] using a Gauss-Newton procedure. Once this is done, the analyte concentrations are provided by equation (1), by introducing the final  $\mathbf{t}_u$  vector found by the RTL procedure. The Tucker3 model is usually constructed with  $N_{\text{unx}}$  components in each dimension,<sup>8</sup> where  $N_{\text{unx}}$  indicates the number of unexpected test sample constituents. This latter number can be tuned by plotting the values of  $s_u$  for increasing  $N_{\text{unx}}$ , until they stabilize at a value compatible with the instrumental noise. Notice that for a single unexpected component, the Tucker3 analysis in equation (3) provides the corresponding profiles in the three dimensions, but for additional unexpected constituents, the retrieved profiles no longer resemble true spectra (or time profiles).

Finally, we note that N-PLS/RTL can easily be extended to even higher data orders, giving rise to N-PLS coupled to residual multi-linearization, or N-PLS/RML, which will certainly be more and more applied in the near future, as data of higher complexity are produced by modern instruments.

**Software.** All routines employed to carry out the calculations described in this paper were written in MATLAB.<sup>41</sup> Those for applying PARAFAC and N-PLS (without the second-order advantage provided by RTL) are available in the internet thanks to Bro.<sup>42</sup> N-PLS/RTL, U-PLS/RTL and TLLS/RTL are available from the authors on request, including a useful graphical user interface for data input and parameter setting, of the type already described for first-order multivariate calibration.<sup>43</sup>

## EXPERIMENTAL

**Apparatus.** Fluorescence spectral measurements were performed on a fast-scanning Varian Cary Eclipse fluorescence spectrophotometer, equipped with two Czerny–Turner monochromators and a xenon flash lamp, and connected to a PC microcomputer via an IEEE 488 (GPIB) serial interface. Excitation-emission-time data arrays were recorded in a 10 mm quartz cell, in the following ranges: excitation, 240-300 nm each 6 nm, emission, 310-390 nm each 4 nm, and time, 0-18 minutes each 2 minutes. Thus, a third-order data array for a given sample was of size  $11 \times 21 \times 10$ , consisting of a total of 2310 data points. The rapid-scanning instrument allows the acquisition of a complete EEM in 0.2 min at a wavelength scanning speed of 24,000 nm/min, considerably smaller than the time between successive measurements. This is important, as it should be noticed that, if reaction significantly evolves during spectral acquisition, the sample data would not be strictly quadrilinear. The cell was thermostated at 40°C.

**Reagents.** All experiments were performed with analytical reagent grade chemicals: *p*-amino benzoic acid and trichloroacetic acid from Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany, and sodium hydroxide from Merck, Darmstadt, Germany. Procaine was obtained from Laboratorio Scott Cassara, Rosario, Argentina, as an aqueous solution containing 452 mg mL<sup>-1</sup>, as determined by a titrimetric method described in the Pharmacopoeia.<sup>44</sup> Equine sera were obtained from the laboratory of the Rosario Racetrack.

**Calibration, validation and spiked serum samples.** A calibration set was constructed composed of eleven samples, using a central composite design with the central point replicated three times. The concentrations were in the ranges 0 to 900 ng mL<sup>-1</sup> (PRO) and 0 to 600 ng mL<sup>-1</sup> (PAB). The analyte concentrations were selected considering the linear fluorescence-concentration range, the drug therapeutic levels, and the molecular weight relation, since PRO is converted into PAB by alkaline hydrolysis. For preparing a given calibration sample, the analytes were mixed in the measuring cell, by taking appropriate volumes of PRO and PAB solutions, and diluting with NaOH 0.1 M to the desired concentration. The excitation-emission-time fluorescence arrays of these solutions were then recorded, and the data were subjected to four-way analysis.

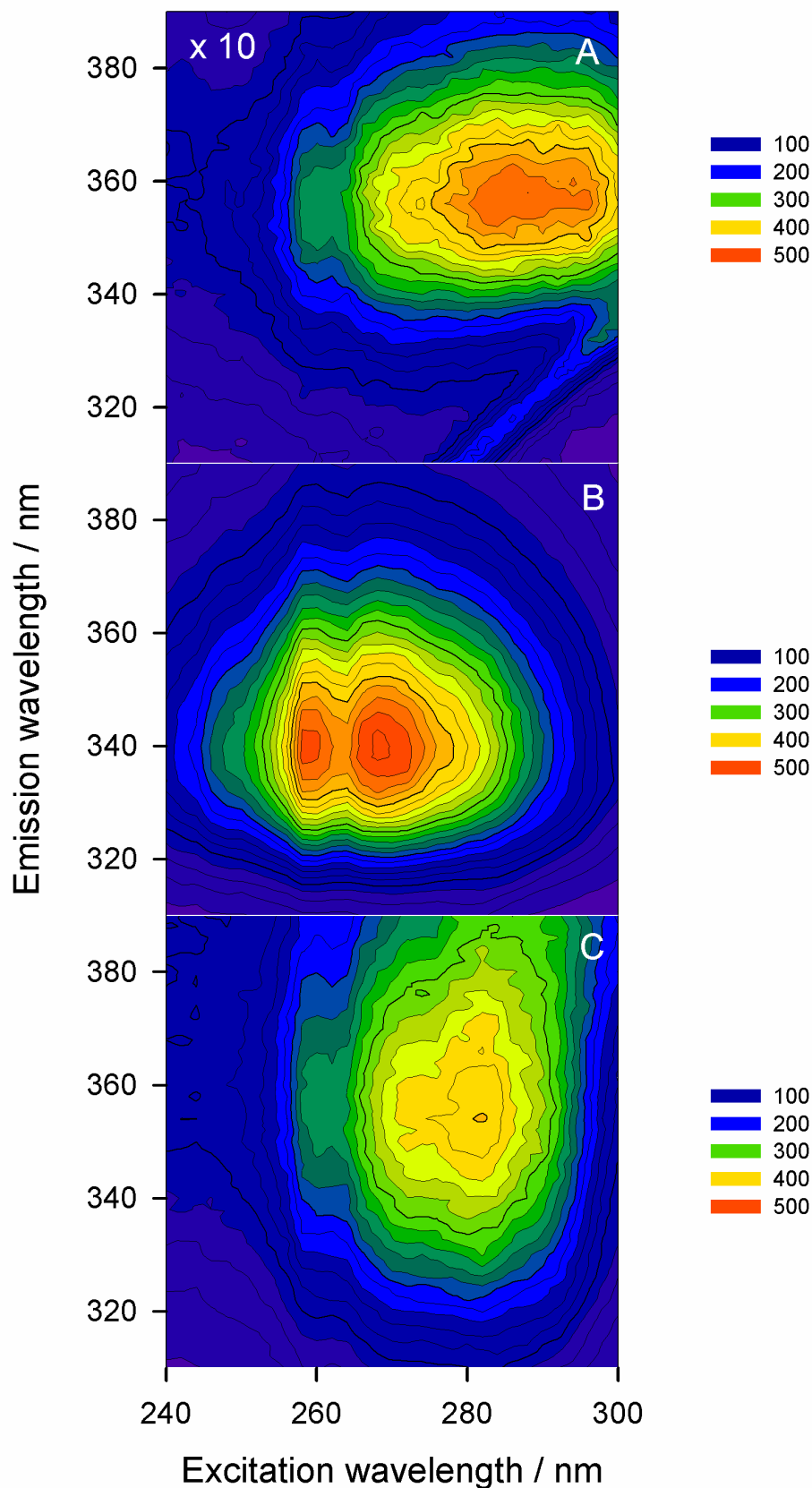
A validation set was also prepared, composed of nine samples, in the same form as those for calibration, but using a random design, i.e., selecting the target concentrations of both analytes at random from each calibration range (see Table 1 for details on the composition of these samples).

Spiked equine serum samples were prepared as follows. Typically, 0.50 mL of a horse serum was spiked with PRO and PAB, treated with 1.50 mL of trichloroacetic acid 2% (v/v) and centrifuged at 3000 rpm during 5 minutes for deproteinization. Finally, 0.40 mL of the supernatant were diluted to a final volume of 2.00 mL with NaOH 0.1 M, and thus the overall degree of dilution of the equine serum was 1:20. Several deproteinization agents were tried, but trichloroacetic acid seemed to provide better results in terms of absence of inner filter effects and level of analyte recovery from protein binding. As will be clear below, a first set of equine sera containing five duplicate concentration levels of PRO was employed to estimate the degree of recovery for PRO after deproteinization. This set (T1) did not contain PAB. The second set of sera, (set T2) spiked with both analytes, was prepared for specific prediction purposes, and contained five duplicate samples, with final concentrations of PRO and PAB selected at random from the corresponding calibration ranges. In both of these sets, each sample contained a different equine serum.

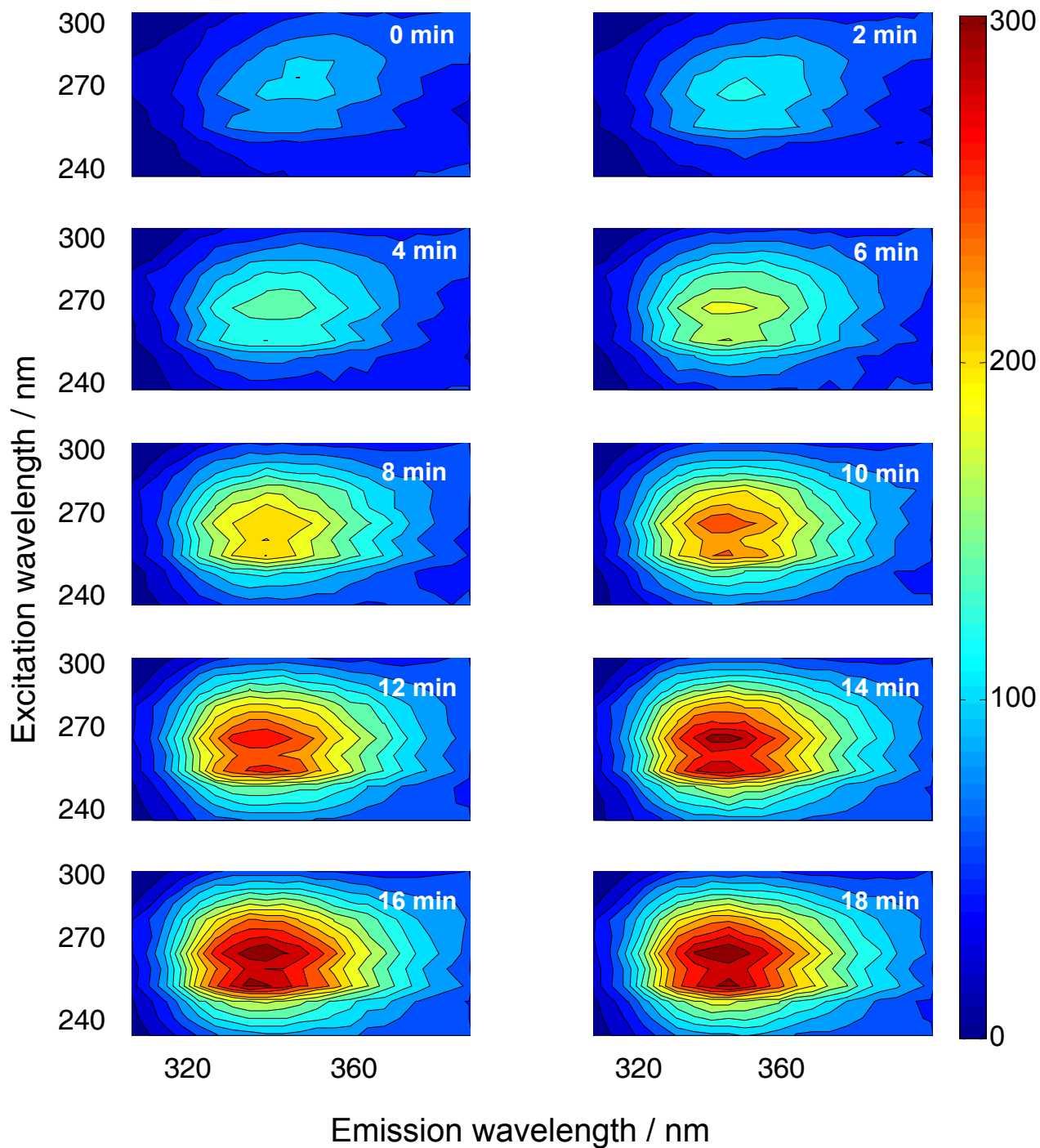
## RESULTS AND DISCUSSION

**Kinetic and spectral characteristics.** Procaine is weakly fluorescent (compare the EEM contours of the analytes PRO and PAB in Figures 1A and 1B), but its hydrolysis in basic medium generates PAB, which is a strongly fluorescent compound (Figure 2). In the working wavelength regions, the signal of the latter is also overlapped with that for a typical horse serum (Figure 1C), making necessary the use of advanced multi-way modelling techniques for quantifying the analytes in the presence of the serum background.

The experimental parameters for the hydrolysis reaction were studied in order to obtain appropriate kinetics and fluorescence properties of the product originated. Increasing the pH and the temperature led to increasing reaction rates, and to decreased fluorescence intensity for PAB. Several pH values were tested in the range between 9 and 13, and temperatures in the range from 13 to 46 °C. This study suggested that pH = 13 and a temperature of 40°C were a sensible choice, mainly because the reaction rate was compatible with the time required to record a single EEM. At this latter temperature the fluorescence intensity of PAB was readily measured.



**Figure 1.** A) Contour plot of the excitation-emission matrix of a solution of PRO ( $900 \text{ ng mL}^{-1}$ ) at  $\text{pH} = 5.0$  to avoid hydrolysis. The intensities have been multiplied by a factor of 10. The coloured bar on the right shows the fluorescence intensities. B) Contour plot of the EEM for a  $500 \text{ ng mL}^{-1}$  solution of PAB at  $\text{pH} = 13$ . C) Contour plot of the EEM for a typical equine serum, after deproteinization and 1:20 dilution at  $\text{pH} = 13$ . Notice the higher fluorescence intensities of PAB and serum in comparison with PRO.

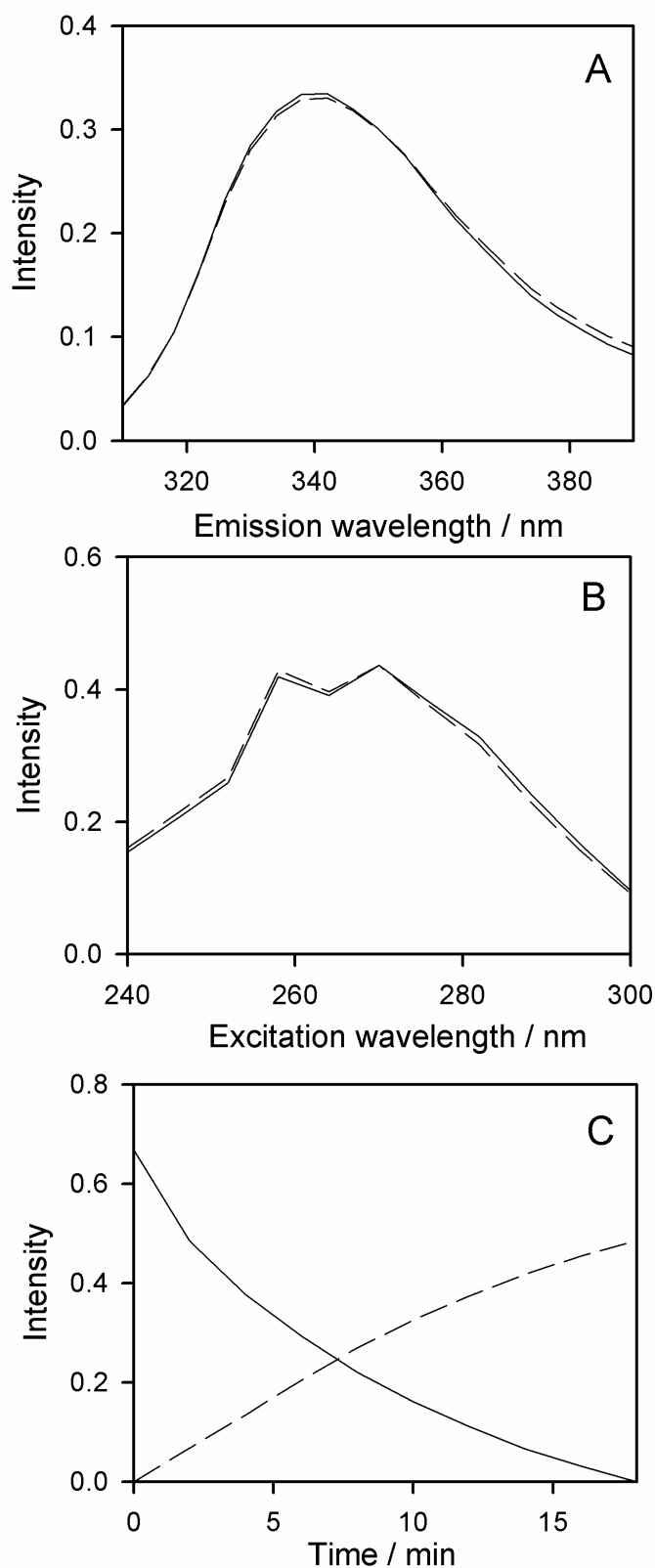


**Figure 2:** Contour plots of the excitation-emission matrices as a function of time (as indicated) for a solution of PRO (700 ng mL<sup>-1</sup>). The coloured bar on the right shows the fluorescence intensities.

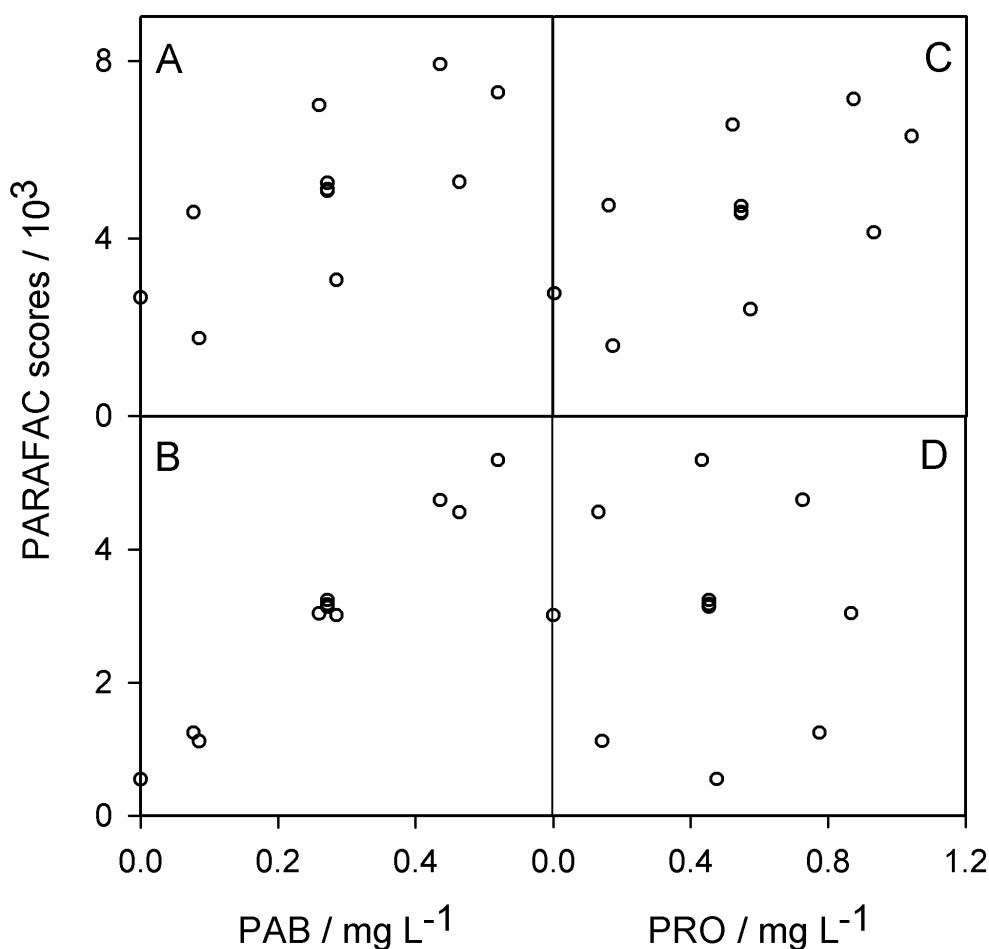
**Validation data.** The first step in processing the data sets with the different third-order algorithms is the assessment of the correct number of sample constituents. With PARAFAC, the standard procedure involves the so-called core consistency diagnostic test (CORCONDIA),<sup>45</sup> which involves observing the changes in the core consistency parameter as the number of trial fluorescent components is increased. The number of components is taken as the largest number for which the latter parameter is larger than about 50. However, in the presently studied system, a high correlation is observed between the concentration of PRO and that for the PAB which forms during hydrolysis of the former. In this case CORCONDIA analysis could not be applied, and one should judge the correct number of components mainly on the basis of the analyst experience.<sup>46,47</sup> Furthermore, the successful application of PARAFAC to the present system requires to initialize the loadings in the spectral and time dimensions with information previously recorded for PAB, which is the major fluorescent species in these samples. Furthermore, all modes were constrained to be non-negative during the least-squares PARAFAC fit, a common practice when facing linear dependency problems.<sup>46,47</sup>

For the validation set of samples, we considered that two components were present, even when the responsive species is only PAB (the one originally present and that produced after PRO hydrolysis), because the fluorescence intensity of PRO is too low (see Figure 1). It is apparent that both PAB contributions can be distinguished by PARAFAC because they present distinct time evolutions, provided the above algorithmic restrictions are imposed. Analysis of a typical validation sample rendered the profiles in the three dimensions which are shown in Figure 3. The emission and excitation profiles for both calibrated components were almost identical and match the expected spectral properties of PAB, but the time profiles differed. The retrieved kinetic profiles are composed of: 1) a time-decreasing profile for one of the spectrally active components and 2) a time-increasing profile for the other component.





**Figure 3.** Spectral profiles recovered by PARAFAC after processing a typical validation sample, containing PRO ( $218 \text{ ng mL}^{-1}$ ) and PAB ( $456 \text{ ng mL}^{-1}$ ): solid line, first PARAFAC component, dashed line, second PARAFAC component A) Spectral emission profiles. B) Spectral excitation profiles. C) Time profiles. All profiles are normalized to unit length.



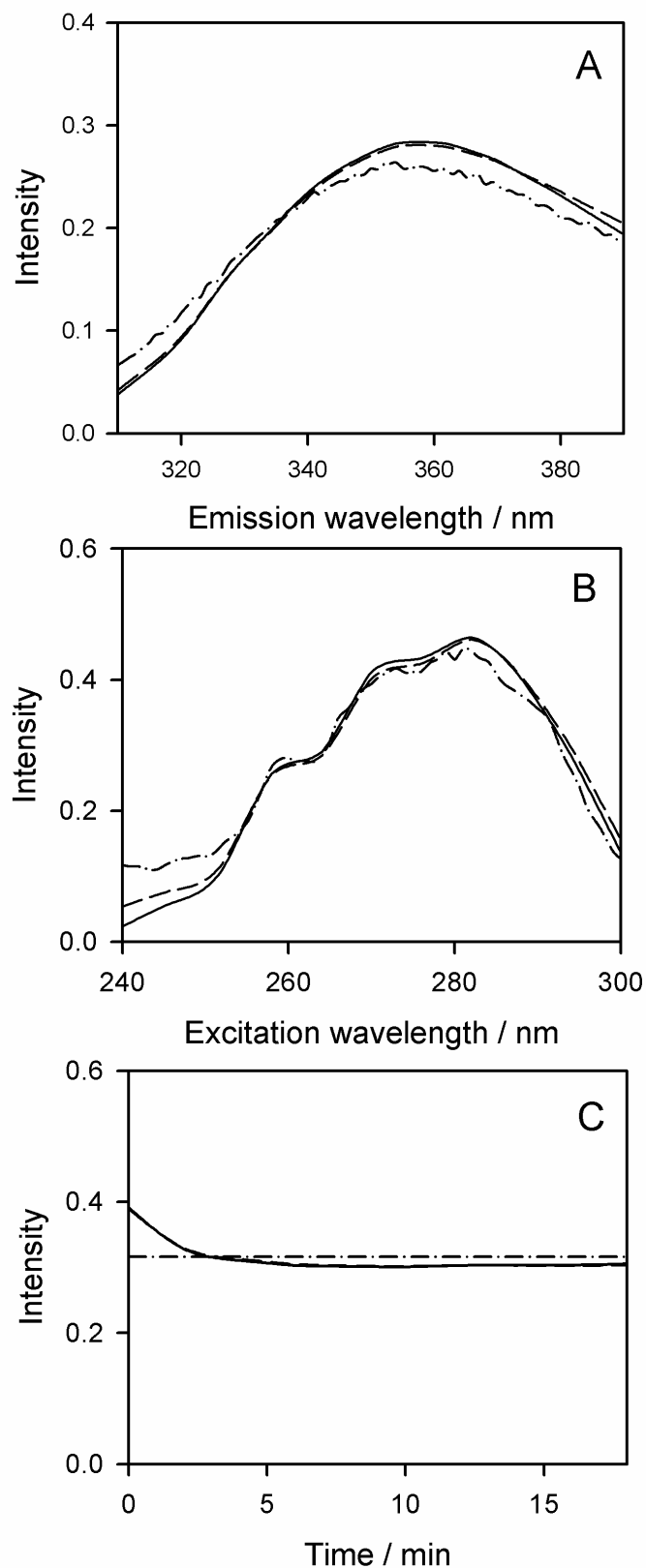
**Figure 4.** PARAFAC **A** scores as a function of nominal analyte concentrations in the calibration set of samples, after processing a typical validation sample. A) First column of matrix **A** as a function of PAB calibration concentrations. B) Second column of **A** as a function of PAB. C) First column of **A** as a function of PRO. D) Second column of **A** as a function of PRO.

These profiles are not the expected ones on the basis of the monitored phenomenon, i.e., a constant signal due to the PAB originally present in the solution, and a growing signal due to PRO being hydrolyzed to PAB. These unexpected profiles suggest the presence of linear combinations in the time mode, which are expressed into corresponding correlations in the PARAFAC **A** or score matrix (the decomposition of the four-way data renders the profiles in the three dimensions which are usually collected into the **B**, **C** and **D** matrices). These correlations translate into pseudo-univariate calibration graphs that do not present the familiar properties with respect to nominal concentrations of either analyte. Figure 4 clearly shows that none of the **A** scores are linearly related to PRO, although one of them provides a distorted central composite design (typical of the presence of correlations between analytes), whereas the correlation with PAB calibration concentrations, although seemingly linear, indicates the presence of a significant intercept.

One alternative to cope with the above problem is to correlate all columns of **A** with concentrations for each analyte using multi linear regression (MLR) analysis instead of classical pseudo-univariate methodology. This approach has been previously applied in the

modelling of a kinetics using four-way fluorescence data.<sup>5</sup> When PARAFAC results were processed in this latter way, analyte concentrations can be reasonably predicted in the validation set of samples. The statistical summary of this analysis is presented in Table 1. As can be seen, good figures of merit are obtained, in terms of root-mean square error (RMSE) and relative error of prediction (REP%), computed with respect to the mean calibration concentration of each analyte.

On the other hand, when using N-PLS (and also U-PLS), a valid procedure for establishing the number of latent variables  $A$  is leave-one-out cross-validation, according to the Haaland and Thomas criterion, as described in the literature.<sup>40</sup> Within the TLLS methodology, the number of components is established as the number of calibrated analytes (two in the present case). None of these approaches required the use of the separate RTL procedure for analyzing the validation samples, since they contain no unexpected interferences. In this sense, the application of N-PLS to the presently studied samples was considerably simpler than PARAFAC, requiring no special initialization conditions or restrictions.



**Figure 5:** A) Emission profiles recovered by PARAFAC (solid line) and N-PLS/RTL (dashed line) after processing a typical spiked equine serum sample. The dashed-dotted line shows the spectrum for a serum sample. B) Spectral excitation profiles, similar to A). C) Time profiles, similar to A). In the time profiles, solid and dashed lines are almost coincident. The dashed-dotted line is a constant at all times. All profiles have been normalized to unit length.

The N-PLS results are collected in Table 1, and are similar to those obtained with its unfolded companions U-PLS and TLLS, but better than those from PARAFAC as regards the content of PRO. The better predictive ability of N-PLS can be related to its more flexible internal structure in comparison with PARAFAC, which makes the former methodology better fitted for processing four-way information which is not strictly quadrilinear. It is interesting to note that the presently applied method is based on a kinetic phenomenon, and therefore the precise timing of the instrumental measurements may be crucial for the success of a given algorithm. The following causes may lead to multi-linearity losses: 1) the time needed to record the complete EEM of a sample in comparison with the reaction progress, and 2) the fact that the analytes are the reagent and product of the hydrolysis reaction. These two sources of multi-linearity losses may seriously affect the less robust algorithm PARAFAC as compared with a latent structured methodology such as N-PLS/RTL.

**Spiked serum samples.** In the case of the set of spiked serum samples, application of PARAFAC followed similar guidelines to those commented above in connection with the study of the validation samples, in the sense of the need of setting correct initialization conditions, and also of the requirement of non-negative constraints during the least-squares fit. The assessment of the number of components could not be done using core consistency diagnostics, and was made by adding trial components to a basis of two known analytes, and then inspecting the PARAFAC least-squares residues until they matched the instrumental noise level. Using this approach, all spiked samples required three responsive components, ascribed to: 1) PAB originally present at the beginning of the reaction, d) PAB produced by hydrolysis of PRO, and 3) serum background. It is noteworthy that PARAFAC decomposition retrieved correctly the spectral (both excitation and emission) and time profiles for serum, which are shown in Figure 5. Indeed, Figures 5A and 5B favourably compare the recovered spectral profiles with those recorded for a typical blank serum sample. Figure 5C, in turn, compares the time evolution with that expected, i.e., a constant value at all times (normalized to unit length). Though the agreement is reasonable, it is however noticed that the PARAFAC time profile suffers an initial decrease until it stabilizes after the first minutes. We attribute this observation, which was repeated consistently for all samples, to temperature instabilities upon placement of the measuring cell in the spectrofluorometer, rather than to any reaction of serum under the applied conditions. Since the fluorescence intensity usually decreases with increasing temperature, the initial decrease in Figure 5C for the serum background is ascribed to changes upon equilibrating the temperature to 40°C, which was selected for obtaining a sensible reaction rate for PRO hydrolysis.

As was the case with the validation data, prediction of analyte concentrations in spiked sera required MLR calibrated with the relevant **A**-scores (i.e., the columns corresponding to the analytes) against nominal calibration concentrations, because of the obtainment of linear combination of analyte scores. Specific prediction results showed that there was a consistent degree of loss of PRO during the deproteinization procedure. A series of spiked sera with several different concentrations of PRO and PAB showed a good correlation of predicted vs. nominal values, but in the case of PRO the linear correlation exhibited a slope which was smaller than the ideal value of 1. In particular, linear regression of predicted vs. nominal PRO concentrations in the set T1 of serum samples (see Experimental) rendered the following results: slope = 0.47(2) (standard deviation in the last significant figure in parenthesis) with an  $r^2 = 0.9819$ . The value of the slope was subsequently employed to correct for the deproteinization loss of PRO when predicting its concentration in the independent set T2. Interestingly, the degree of binding of PRO to serum proteins has been estimated to be ca. 45%,<sup>48</sup> and thus we attribute the lower value of the slope in the case of PRO to this binding phenomenon.

To demonstrate how consistent are the results on analyte recovery after serum deproteinization, a set of sera spiked with both analytes (T2) was studied, and the predicted PRO concentrations by PARAFAC were adjusted according to the slope value. The results on the set T2 are shown in Table 2. It is apparent that the RMSE and REP% values are reasonable in view of the complexity of the presently studied biological samples.

When applying N-PLS to these spiked sera, it was necessary to assess the number of unexpected components ( $N_{\text{unx}}$ ) to be employed in the RTL procedure. This can be done by analyzing the residuals  $s_u$  as a function of a trial number of unexpected components, as has already been described. A typical result for one of the analyzed samples was as follows,  $s_u = 45, 6.2, 4.4,$  and  $4.3$  for  $N_{\text{unx}} = 0, 1, 2$  and  $3$  respectively. Prior to this analysis, blank replication allowed to estimate an instrumental noise level of ca. 5 AFU (arbitrary fluorescence units). Therefore, it is clear that for this particular samples  $N_{\text{unx}} = 1$  is the correct choice. Similar results were obtained for the remaining samples.

Application of the N-PLS/RTL methodology to this set led to the retrieval of unexpected serum spectral and time profiles, which can be compared with those expected for background serum. Figures 5A, 5B and 5C show that RTL is able to recover profiles of a quality comparable to that of PARAFAC, implying that the former approach is valid for achieving the second-order advantage. Moreover, the subtle effects discussed above concerning the slight decrease of fluorescence intensity for serum in the first reaction minutes are also observable in the RTL time profile of Figure 5C.

Concerning the specific prediction results, better figures of merit were obtained with N-PLS/RTL in comparison with those furnished by PARAFAC. First the set T1 of serum samples spiked only with PRO was studied, in order to assess the level of recovery after deproteinization. This study yielded, for N-PLS/RTL, slope =  $0.45(2)$  ( $r^2 = 0.9930$ ), i.e., similar to PARAFAC (see above). Subsequent prediction on the second independent set T2 of spiked equine sera gave the results shown in Table 2. As can be seen, the results are better than those for PARAFAC, again pointing to an improved predicting ability of the latent structured methodology N-PLS/RTL.

Application of the unfolded methodologies TLLS/RTL and U-PLS/RTL gave results which are similar to those obtained with N-PLS/RTL. Recovery of PRO on the set T1 gave the following results: U-PLS/RTL, slope =  $0.45(2)$  ( $r^2 = 0.9890$ ), and TLLS/RTL, slope =  $0.51(2)$  ( $r^2 = 0.9874$ ). Prediction on set T2, in turn, provided comparable results to N-PLS/RTL, except in the case of U-PLS/RTL for PRO (Table 2), which are comparable to PARAFAC.

## CONCLUSIONS

The use of kinetics in combination with excitation-emission fluorescence matrices measured with a fast-scanning fluorimetric detector allows the recording of four-way data sets. Several unfolded algorithms are available for processing four-way information, although they do not take full advantage of the higher-order data structure. In comparison, multiway partial least-squares is a genuine higher-order latent variable method, which, once combined with the successful residual tri-linearization technique, achieves the second-order advantage needed to successfully quantify analytes in complex biological samples. The latter combination of techniques which is proposed in this report, i.e., N-PLS/RTL, is currently the only competitor available to parallel factor analysis in the realm of truly higher-order analysis achieving the important second-order advantage. It certainly deserves a place among the few available multi-way chemometric methods for advanced modelling studies, and is demonstrated to perform better than PARAFAC in the presently studied samples. This is because of the more flexible internal structure of N-PLS/RTL in comparison with PARAFAC,

which makes the former a more appropriate approach for processing four-way data which are not strictly quadrilinear.

## **ACKNOWLEDGMENT**

Universidad Nacional de Rosario, CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Project No. PIP 5303), ANPCyT (Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, Project No. PICT-25825), Ministerio de Educación y Ciencia of Spain (Project CTQ2005-02389) and AECI (Programa Intercampus Iberoamérica/PCI Project A/6576/06), are gratefully acknowledged for financial support. AJG thanks Ministerio de Eudación y Ciencia of Spain and AGR thanks CONICET for fellowships.

## REFERENCES

- (1) Ichinose, N.; Schwedt, G.; Schnepel, F. M.; Adachi, K. *Fluorometric analysis in biomedical chemistry*; John Wiley & Sons: New York, 1987.
- (2) Booksh, K. S.; Kowalski, B. R. *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 782A-791A.
- (3) Smilde, A.; Bro, R.; Geladi, P. *Multi-way analysis. Applications in the chemical sciences*, Wiley: Chichester, 2004.
- (4) Bro, R. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2006**, *36*, 279-293.
- (5) Nikolajsen, R. P. H.; Booksh, K. S.; Hansen, A. M.; Bro, R. *Anal. Chim. Acta* **2003**, *475*, 137-150.
- (6) Tan, Y.; Jiang, J. H.; Wu, H. L.; Cui, H.; Yu, R. Q. *Anal. Chim Acta*, **2000**, *412*, 195-202.
- (7) Nahorniak, M. L.; Cooper, G. A.; Kim, Y. C.; Booksh, K. S. *Analyst* **2005**, *130*, 85-93.
- (8) Olivieri, A. C.; Arancibia, J. A.; Muñoz de la Peña, A.; Durán Merás, I.; Espinosa Mansilla, A. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 5657-5666.
- (9) Muñoz de la Peña, A.; Durán Merás, I.; Jiménez Girón, A. *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, *385*, 1289-1297.
- (10) Muñoz de la Peña, A.; Durán Merás, I.; Jiménez Girón, A.; Goicochea H. C. *Talanta* **2007**, *71*, 806-815.
- (11) Kim, Y. C.; Jordan, J. A.; Nahorniak, M. L.; Booksh, K. S. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 7679-7686.
- (12) Goicochea, H. C.; Yu, S.; Olivieri, A. C.; Campiglia, A. D. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 2608-2616.
- (13) Porter, S. E. G.; Stoll, D. R.; Rutan, S. C.; Carr, P. W.; Cohen, J. D. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 5559-5569.
- (14) Bro, R. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **1997**, *38*, 149-171.
- (15) Arancibia, J. A.; Olivieri, A. C.; Bohoyo Gil, D.; Muñoz de la Peña, A.; Durán-Merás, I.; Espinosa Mansilla, A. *Chemom. Intell Lab. Syst.* **2006**, *80*, 77-86.
- (16) Wold, S.; Geladi, P.; Esbensen, K.; Öhman, J. *J. Chemometrics* **1987**, *1*, 41-56.
- (17) Öhman, J.; Geladi, P.; Wold, S. *J. Chemometrics* **1990**, *4*, 79-90.
- (18) Olivieri, A. C. *J. Chemometrics* **2005**, *19*, 253-265.
- (19) Bohoyo Gil, D.; Muñoz de la Peña, A.; Arancibia, J. A.; Escandar, G. M.; Olivieri, A. C. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 8051-8058.
- (20) Culzoni, M. J.; Goicochea, H. C.; Pagani, A. P.; Cabezón, M. A.; Olivieri, A. C. *Analyst* **2006**, *131*, 718-732.
- (21) García-Reiriz, A.; Damiani, P. C.; Olivieri, A. C. *Talanta* **2007**, *71*, 806-815.
- (22) Bro, R. *J. Chemometrics* **1996**, *10*, 47-61.
- (23) Reynolds, J. E. F. (Ed.), *W. Martindale, Extra Pharmacopoeia*, XXXI, Pharmaceutical Press, London, 1996, p. 76.
- (24) Turner, P.; Volans, G.; Wiserman, H. *Drugs Handbook*, McMillan, London, 1993, p. 76.
- (25) Committee for Veterinary Medicinal Products, *Procaine*. Summary Report EMEA/MRL/217/97-FINAL of the Veterinary Medicines Evaluation Unit, European Agency for the Evaluation of Medicine Products, January 1998.
- (26) Storms, M. L.; Stewart, J. T. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2002**, *30*, 49-58.
- (27) Berzas Nevado, J. J.; Murillo Pulgarín, J. A.; Reillo Escudero, O. I. *Appl. Spectrosc.* **2000**, *54*, 1678-1683.
- (28) Einosuke, T.; Yuji, N.; Xuan, Z. S.; Shogo, M.; Yukio, K.; *Jpn. J. Forensic Toxicol.* **1995**, *13*, 11-16.
- (29) Carretero, A. S.; Cruces-Blanco, C.; Peinado, S. F.; Bergmi, R. E. I.; Gutiérrez, A. F. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1999**, *21*, 969-974.



- (30) Badea, I.; Moja, D.; Vladescu, L. *Anal. Biochem.* **2002**, *374*, 51-53.
- (31) Vanquerp, V.; Rodriguez, C.; Coiffard, C.; Coiffard, L. J. M.; De Roeck-Holtzhauer, Y. *J. Chromatogr. A* **1999**, *832*, 273-277.
- (32) Kastel, R.; Rosival, I.; Blahovec, J. *Biomed. Chromatogr.* 1994, *8*, 294-296.
- (33) Stokes, D. L.; Vo-Dinh, T. *Sens. Actuators B* **2000**, *69*, 28-36.
- (34) Chen, L. C.; Hu, M. L. *J. Food Drug Anal.* **1996**, *4*, 75-87.
- (35) Yang, H.; Thyron, F. C. *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* **1998**, *21*, 1347-1357.
- (36) Rop, P. P.; Grimaldi, F.; Bresson, M.; Fornaris, M.; Viala, A. *J. Liq. Chromatogr.* **1993**, *16*, 2797-2811.
- (37) Dhananjeyan, M. R.; Bykowski, C.; Trendel, J. A.; Sarver, J. G.; Andob, H.; Erhardt, P. *W. J. Chromatography B* **2007**, *847*, 224-230.
- (38) Kondritzer A. A.; Zvirblis P. *J. Am. Pharm. Assoc.* **1957**, *46*, 531-535.
- (39) Bro, R. *Multi-way analysis in the food industry*, Doctoral Thesis, University of Amsterdam, Netherlands, 1998.
- (40) Haaland, D. M.; Thomas, E. V. *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 1193-1202.
- (41) MATLAB 6.0, The MathWorks Inc., Natick, MA, 2000.
- (42) <http://www.models.kvl.dk/source/>
- (43) Olivieri, A. C.; Goicoechea, H. C.; Iñón, F. A. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2004**, *73*, 189-197.
- (44) *British Pharmacopoeia*, Her Majesty's Stationary Office: London, 2003, pp. 7, 94 and 258.
- (45) Bro, R.; Kiers, H. A. L. *J. Chemometrics* **2003**, *17*, 274-286.
- (46) Espinosa-Mansilla, A.; Muñoz de la Peña, A.; Goicoechea, H. C.; Olivieri, A. C. *Appl. Spectrosc.* **2004**, *58*, 83-90.
- (47) Marsili, N. R.; Lista, A.; Fernandez Band, B. S.; Goicoechea, H. C.; Olivieri, A. C. *J. Agric. Food. Chem.* **2004**, *52*, 2479-2484.
- (48) Tobin, T.; Blake, J. W. *Brit. J. Sport Med.* **1976**, *10*, 109-116.

**Table 1. Validation results using the different algorithms.<sup>a</sup>**

Nominal / ng mL <sup>-1</sup>	Procaine			
	PARAFAC	N-PLS	TLLS	U-PLS
218	221	223	221	225
607	602	603	607	603
587	583	595	598	595
251	284	275	275	275
657	683	684	687	681
390	414	401	402	401
700	722	724	728	722
668	672	674	678	672
263	273	259	258	260
RMSE / ng mL <sup>-1</sup>	18	15	17	14
REP%	4.0	3.3	3.8	3.1
<i>p</i> -Amino benzoic acid				
Nominal / ng mL <sup>-1</sup>	Predicted / ng mL <sup>-1</sup>			
	PARAFAC	N-PLS	TLLS	U-PLS
456	473	469	475	469
307	299	307	304	307
484	475	489	487	489
233	243	233	237	233
290	287	300	295	300
167	170	165	166	165
383	367	385	380	386
394	392	410	406	410
170	185	173	177	173
RMSE / ng mL <sup>-1</sup>	11	8	8	8
REP%	3.7	2.7	2.7	2.7

<sup>a</sup> RMSE = root mean square error; REP% = relative error of prediction.

---

**Table 2. Spiked sera results using the different algorithms on set T2.**

		Procaine			
Nominal / ng mL <sup>-1</sup>		Predicted <sup>b</sup> / ng mL <sup>-1</sup>			
		PARAFAC	N-PLS/RTL	TLLS/RTL	U-PLS/RTL
0		57	38	-35	-20
0		0	-38	-88	20
540		651	614	529	580
747		919	834	759	1003
567		612	580	494	700
RMSE / ng mL <sup>-1</sup>		97	55	54	109
REP%		22	12	12	24
		<i>p</i> -Amino benzoic acid			
Nominal / ng mL <sup>-1</sup>		Predicted / ng mL <sup>-1</sup>			
		PARAFAC	N-PLS/RTL	TLLS/RTL	U-PLS/RTL
300		320	297	320	297
0		70	54	70	55
110		170	147	150	149
250		310	317	325	310
400		445	416	445	405
RMSE / ng mL <sup>-1</sup>		54	42	54	40
REP%		18	14	18	13

<sup>a</sup> RMSE = root mean square error; REP% = relative error of prediction. Predictions are averages of duplicate samples.

<sup>b</sup> Predicted values were corrected using the correction factor for deproteinization (see text).

---

