



DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA
Universidad de Extremadura
Facultad de Ciencias

TESIS DOCTORAL

**UTILIZACIÓN DE SEÑALES DE PRIMER Y SEGUNDO ORDEN PARA EL ANÁLISIS
DE FLUOROQUINOLONAS Y CARBAMACEPINAS EN FLUIDOS BIOLÓGICOS**

David González Gómez
Badajoz, 2005

**UTILIZACIÓN DE SEÑALES DE PRIMER Y SEGUNDO ORDEN PARA EL ANÁLISIS
DE FLUROQUINOLONAS Y CARBAMACEPINAS EN FLUIDOS BIOLÓGICOS**

por

David González Gómez

VISADO en Badajoz a 25 de enero de 2005

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

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

Memoria de Investigación presentada para optar al Grado de Doctor.

Fdo.: David González Gómez



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 **“UTILIZACIÓN DE SEÑALES DE PRIMER Y SEGUNDO ORDEN PARA EL ANÁLISIS DE FLUOROQUINOLONAS Y CARBAMACEPINAS EN FLUIDOS BIOLÓGICOS”**, ha sido realizado bajo la dirección de la Dra. Dña. **Anunciación Espinosa Mansilla** y el Dr. Don **Arsenio Muñoz de la Peña Castrillo**, en el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Extremadura y reúne todos los requisitos para poder optar al Grado de Doctor en Ciencias Sección de Químicas.

Badajoz, 25 de Enero de 2004

Objeto de la Tesis Doctoral

El presente trabajo de investigación tiene como objeto el estudio de las propiedades luminescentes de un grupo de fluoroquinolonas (norfloxacin, enoxacin, ofloxacin, enrofloxacin y ciprofloxacino) y carbamacepinas (5H-dibenzo[*b,f*]acecina-5-carboxamida y carbamacepina-10,11-epóxido). Se desarrollan métodos de análisis empleando diferentes técnicas quimiométricas de calibración multivariante de primer y segundo orden, en diferentes medios; disolución acuo-orgánica, medio micelar y en soportes sólidos. Se establece el efecto de la irradiación UV sobre las propiedades luminiscentes de los analitos en estudio. Por otra parte se estudian métodos cromatográficos basados en HPLC para la determinación de fluoroquinolonas en fluidos biológicos.

Capítulo I : Introducción

1. Introducción.....	3
<i>Clasificación química.....</i>	5
<i>Estructura química.....</i>	6
<i>Mecanismo de acción.....</i>	7
<i>Espectro de acción.....</i>	8
<i>Resistencia.....</i>	8
<i>Difusión y excreción.....</i>	9
<i>Características farmacocinéticas.....</i>	10
<i>Concentraciones habituales en fluidos biológicos.....</i>	11
<i>Interacciones con otros principios activos.....</i>	12
<i>Efectos Adversos.....</i>	12
<i>Campos de aplicación.....</i>	13
2. Revisión bibliográfica.....	15
3. Aparatos y reactivos utilizados.....	23
<i>Aparatos.....</i>	23
<i>Reactivos.....</i>	24
<i>Programas Informáticos.....</i>	25

Capítulo II: Estudio de las propiedades fluorescentes de norfloxacin, enoxacin, ofloxacin, ciprofloxacino y enrofloxacin en disolución

1. Estudio de las propiedades analíticas del norfloxacin.....	27
<i>Comportamiento frente a diferentes disolventes.....</i>	27
<i>Influencia de la acidez del medio.....</i>	28
<i>Determinación de los valores de pK_a.....</i>	33
<i>Efecto de la adición de un agente surfactante.....</i>	36
<i>Efecto de la adición de agentes oxidantes.....</i>	38
<i>Efecto de la irradiación externa.....</i>	38
2. Estudios de las propiedades analíticas del enoxacin.....	39
<i>Comportamiento frente a diferentes disolventes.....</i>	39
<i>Influencia de la acidez del medio.....</i>	40
<i>Efecto de la adición de un agente surfactante.....</i>	45
<i>Efecto de la adición de agentes oxidantes.....</i>	47
<i>Efecto de la irradiación externa.....</i>	50
3. Estudios de las propiedades analíticas del ofloxacin.....	51
<i>Comportamiento frente a diferentes disolventes.....</i>	51
<i>Influencia de la acidez del medio.....</i>	52
<i>Efecto de la adición de un agente surfactante.....</i>	57
<i>Efecto de la adición de agentes oxidantes.....</i>	58
<i>Efecto de la irradiación externa.....</i>	60

4. Estudios de las propiedades analíticas del ciprofloxacino.....	61
<i>Comportamiento frente a diferentes disolventes.....</i>	61
<i>Influencia de la acidez del medio.....</i>	62
<i>Efecto de la adición de un agente surfactante.....</i>	67
5. Estudio de las propiedades analíticas del enrofloxacin.....	69
<i>Comportamiento frente a diferentes disolventes.....</i>	69
<i>Influencia de la acidez del medio.....</i>	70
<i>Efecto de la adición de un agente surfactante.....</i>	74
6. Resumen.....	75

Capítulo III: Determinación simultánea de norfloxacino, enoxacino y ofloxacino, en sus mezclas sintéticas y en fluidos biológicos

1. Introducción.....	77
<i>Regresión lineal múltiple (MLR).....</i>	81
<i>Método CLS.....</i>	83
<i>Método ILS.....</i>	84
<i>Análisis por componentes principales (PCA).....</i>	85
<i>Método PCR.....</i>	86
<i>Método PLS.....</i>	88
<i>Optimización del número de loading.....</i>	90
<i>Selección de la región espectral.....</i>	95

<i>Detección de muestras discrepantes o outliers.....</i>	96
<i>Comparación de los métodos multivariantes CLS, PCR y PLS.....</i>	97
<i>La señal neta del analito en PLS.....</i>	103
<i>Los parámetros de calidad en análisis multivariante.....</i>	98
2. Procedimiento de trabajo. Elección de las condiciones químicas y de los parámetros instrumentales.....	105
 <i>Estudio de la linealidad.....</i>	 109
<i>Matriz de Calibración.....</i>	114
3. Determinación simultánea de norfloxacin, enoxacin y ofloxacin en muestras de problemas sintéticos.....	121
 <i>Repetitividad.....</i>	 126
<i>Cálculo de los parámetros de calidad.....</i>	129
4. Determinación simultánea de derivados fluoroquinolónicos en fluidos biológicos.....	131
Capítulo IV: Determinación de norfloxacin, enoxacin y ofloxacin mediante PARAFAC. Utilización de matrices de excitación y emisión	
1. Introducción.....	145
 <i>Tipo de datos analíticos.....</i>	 145
<i>Datos multivariantes.....</i>	147
<i>Concepto de unfolding.....</i>	149

<i>Modelos trilineales</i>	150
<i>Modelo PARAFAC</i>	151
<i>Estructura del modelo</i>	151
<i>Unicidad</i>	154
<i>Otros modelos trilineales</i>	157
<i>CANDECOMP</i>	157
<i>PMF3</i>	157
<i>RAFA, GRAM, DTD</i>	158
<i>Comparación de DTD con PARAFAC</i>	159
<i>Preprocesado de datos</i>	165
<i>Número de componentes</i>	167
<i>Aspectos relacionados con PLS, n-PLS y PARAFAC</i>	170
2. <i>Determinación simultánea de norfloxacino, enoxacino y ofloxacino en suero</i>	173
<i>Calibración y set de validación</i>	174
<i>Calibración multivariante con datos de tercer orden</i>	176
<i>Software utilizado</i>	179
<i>Análisis de matrices de excitación-emisión fluorescente</i>	180
<i>Método de calibración y validación en conjunto de predicción</i>	182
<i>Aplicación de PARAFAC al análisis de muestras de suero</i> ..	184
<i>Selección del número de factores</i>	186
<i>Parámetros de calidad</i>	192

Capítulo V: Efectos de la irradiación UV en las características luminiscentes de norfloxacin, enoxacin, ofloxacin, ciprofloxacino y enrofloxacin

1. Introducción.....	195
2. Experimental.....	203
2.1 Efectos de la irradiación UV en las características luminiscentes del enoxacin.....	203
Influencia de la composición del disolvente.....	203
Influencia de la presencia de peróxido de hidrógeno	206
Influencia de la acidez del medio en le proceso de irradiación	211
Comportamiento acido-base del fotoproducto.....	216
Estudio de la linealidad de la señal fluorescente del fotoproducto en función de la concentración de enoxacin al pH óptimo de irradiación.....	223
Recta de calibrado para la determinación de enoxacin mediante fotoinducción.....	225
2.2 Efectos de la irradiación UV en las características luminiscentes del norfloxacin.....	227
Influencia de la acidez del medio en el proceso de fotoirradiación.....	229
Comportamiento ácido-base del fotoproducto generado a partir del norfloxacin.....	234
Recta de calibrado para la determinación de norfloxacin mediante fotoinducción.....	239

2.3 Efectos de la irradiación UV en las características luminiscentes del ofloxacino.....	243
<i>Influencia de la acidez del medio en el proceso de irradiación del ofloxacino.....</i>	244
<i>Recta de calibrado para la determinación de ofloxacino mediante fotoinducción.....</i>	245
2.4 Efectos de la irradiación UV en las características luminiscentes del ofloxacino.....	249
<i>Influencia de la acidez del medio en el proceso de irradiación del ciprofloxacino.....</i>	251
<i>Comportamiento del fotoproducto generado a partir del ciprofloxacino.....</i>	255
<i>Recta de calibrado para la determinación de ciprofloxacino mediante fotoinducción.....</i>	259
2.5 Efectos de la irradiación UV en las características luminiscentes del enrofloxacino.....	261
<i>Influencia de la acidez del medio en el proceso de irradiación del enrofloxacino.....</i>	263
<i>Comportamiento acido-base del fotoproducto generado a partir del enrofloxacino.....</i>	251
<i>Recta de calibrado para la determinación del enrofloxacino mediante fotoinducción.....</i>	265
3. Estudios cromatográficos preliminares para la caracterización de los fotoproductos generados en los procesos de irradiación de fluorquinolonas.....	267

<i>Comportamiento cromatográfico de las disoluciones de norfloxacinó.....</i>	269
<i>Comportamiento cromatográfico de las disoluciones de enoxacino.....</i>	274
<i>Comportamiento cromatográfico de las disoluciones de ofloxacino.....</i>	277
<i>Modificaciones de las condiciones experimentales.....</i>	279

4. Breve resumen de las conclusiones más destacables de este capítulo...	283
--	------------

Capítulo VI: Determinación simultánea de norfloxacinó, enoxacino y ofloxacino en orina mediante fluorescencia fotoinducida

1. Introducción.....	289
<i>SWATLD: Modelo y algoritmo.....</i>	295
2. Experimental.....	301
<i>Diseño de la matriz de calibración.....</i>	301
<i>Calibración multivariante empleando PLS-1.....</i>	206
<i>Calibración multivariante empleando N-PLS y unfolded-PLS.....</i>	307
<i>Calibración multivariante empleando PARAFAC y SWATLD.....</i>	308
<i>Validación de los métodos.....</i>	310

3. Determinación simultánea de norfloxacin, enoxacin y ofloxacin en muestras de orina.....	315
<i>Muestras de orina.....</i>	315
<i>Resultados del análisis.....</i>	317
<i>Calibración usando patrones en presencia de orina y muestras de blancos de orina (Calibración B).....</i>	321
4. Breve resumen de las conclusiones más destacables de este capítulo...	329

Capítulo VII. Separación y determinación de norfloxacin, enoxacin, ofloxacin, ciprofloxacino y Eerofloxacin mediante cromatografía líquida de alta eficacia

1. Introducción.....	331
<i>Elección de la fase móvil.....</i>	334
<i>Parámetros cromatográficos.....</i>	336
<i>Selección del caudal de fase móvil.....</i>	337
2. Experimental.....	341
<i>Influencia de la acidez.....</i>	341
<i>Selección de la composición de la fase móvil. Selección de modificadores orgánicos.....</i>	342
<i>Influencia de la presencia de acetonitrilo.....</i>	343
<i>Influencia de la presencia de metanol.....</i>	344

<i>Influencia de la presencia de tetrahidrofurano.....</i>	346
<i>Linealidad.....</i>	349
<i>Establecimiento de la linealidad para la determinación de enoxacino, ofloxacino, enrofloxacino y norfloxacino.....</i>	349
<i>Repetitividad.....</i>	355
3. Determinación de enoxacino, ofloxacino, enrofloxacino y norfloxacino en orina.....	356
4. Determinación de enoxacino, ofloxacino, enrofloxacino y norfloxacino en suero plasmático.....	368
5. Efectos de la irradiación externa.....	377
<i>Optimización del tiempo de irradiación.....</i>	377
<i>Separación cromatográfica previa irradiación.....</i>	380
<i>Estabilidad de los fotoproductos.....</i>	382
<i>Linealidad.....</i>	383
<i>Repetitividad del método.....</i>	371
6. Determinación de enoxacino, norfloxacino, ciprofloxacino y ofloxacino en orina, previa irradiación.....	391
7. Determinación de enoxacino, norfloxacino, ciprofloxacino y ofloxacino en suero plasmático previa irradiación.....	399
8. Comparación entre las metodologías basadas en irradiación previa y en seguimiento de fluorescencia nativa	407

Capítulo VIII: Determinación de carbamacepina en suero plasmático y formulaciones farmacéuticas utilizando inmovilización en soporte de nylon, detección fluorimétrica y técnicas quimiométricas

1. Introducción.....	409
<i>Antecedentes bibliográficos.....</i>	411
<i>Modo de preparación de las muestras e instrumental empleado.....</i>	413
<i>Fundamento teórico del análisis quimiométrico.....</i>	415
2. Consideraciones experimentales.....	419
<i>Naturaleza de la superficie sólida.....</i>	419
<i>Influencia de la naturaleza del disolvente.....</i>	421
3. Determinación simultánea de carbamacepina y carbamacepina-10,11-epóxido.....	425
<i>Análisis en muestras de suero humano enriquecido.....</i>	431
4. Determinación de carbamacepina en preparados farmacéuticos.....	437
5. Conclusiones.....	439

Apéndices. Programas informáticos desarrollados en esta memoria.

Apéndice A: Programa informático Análisis de Calibración de Orden Cero ACOC

1. Introducción.....	441
2. Teoría.....	442
3. Software.....	453
<i>Ejemplo.....</i>	<i>454</i>

Apéndice B: Programa informático CLS

1. Software.....	469
------------------	-----

Conclusiones	475
---------------------------	------------

Trabajos Publicados

1. Interference-free analysis using three-way fluorescence data and the Parallel Factor Model. Determination of fluoroquinolones antibiotics in human serum (Arsenio Muñoz de la Peña, Anunciación Espinosa Mansilla, David González Gómez, Alejandro C. Olivieri, Hector C. Goicoechea, *Analytical Chemistry*, 75, 2640, 2003)

2. Spectrophotometric analysis of mixtures by classical least-squares calibration. An advanced experiment introducing MATLAB (Chemical Educator, 8, 187, 2003)
3. Unusually induced fluorescence of carbamazepine supported on a nylon membrane. Analytical applications (Analytical Chimica Acta, 506, 161, 2004)
4. Partial least square multicomponent fluorimetric determination of fluoroquinolones in human urine samples (Talanta, 62, 853, 2004)
5. Photoinduced spectrofluorimetric determination of fluoroquinolones in human urine by using three- and two-way spectroscopy data and multivariate calibration (Analytica Chimica Acta, en prensa)

Trabajos Enviados

1. Univariate linear regression calibration software in MATLAB environment. Application to the laboratory practices by chemistry students. (Enviado a The Chemical Educator)
2. Generation of photodegradation products from second generation fluoroquinolones. Luminescence properties of enoxacin, ofloxacin, norfloxacin, ciprofloxacin and enrofloxacin photoproducts. (Enviado a Analytical Letters)
3. Determination of fluoroquinolones in urine and serum by high performance liquid chromatography and multiemission scan fluorimetric detection (Enviado a Talanta)

Capítulo I.

Introducción, revisión bibliográfica, aparatos y reactivos

1. Introducción

En esta introducción se hablará de las fluoroquinolonas. A esta familia de compuesto se ha dedicado la mayor parte de capítulos que constituyen esta memoria de investigación. En el capítulo ocho, donde se abordan los estudios correspondientes a las carbamacepinas, se hará la correspondiente introducción.

A principios de la década de los años 60, Lescher y colaboradores, en plena síntesis de la cloroquina, descubren, de forma fortuita, la primera 4-quinolona, denominándola ácido nalidíxico¹.

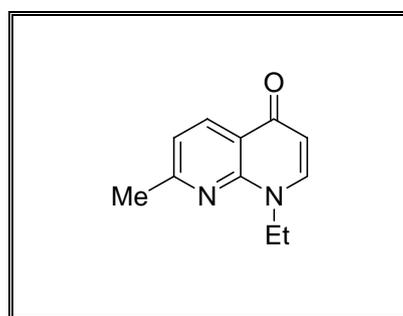


Figura 1. Ácido Nalidíxico

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 uno o varios átomos de flúor en el núcleo básico, aparecen las primeras 4-fluoroquinolonas, también llamadas quinolonas de segunda generación, encabezadas por el norfloxacin y seguidas por el pefloxacin, ofloxacin, ciprofloxacino, fleroxacin y temafloxacin (esta último 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 tolerancia².

¹ Andriole V.T. Las quinolonas. Ed. Academia Press, Limited London, 1989, pg 1-287

² Damaso, D. Quimioterápicos II. Ácido Nalidíxico y análogos. Quinolonas. Fluoroquinolonas. Antibacterianos. Ed. Marketing Pharm SA. Madrid 1990, 135-175

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*)³.

En los últimos tres años han sido aprobadas cinco nuevas quinolonas (*moxifloxacino*, *gatifloxacino*, *clinafloxacino*, *trovafloxacino*, *sifafloxacino*) también conocidas como quinolonas de cuarta generación, las cuales incluyen en su espectro los gérmenes anaerobios^{4,5}.

Por último, se encuentran en estudio, pendientes de aprobación por la FDA, las quinolonas gemifloxacino, pazufloxacino y balofloxacino, las dos primeras con el mismo espectro que las anteriores, siendo la gemifloxacino, la más potente quinolona contra el *Streptococcus pneumoniae*, la última, con una importante acción sobre las micobacterias (*M. Tuberculosis*, *M. Kansassi* y *M. Fortuitum*)⁶⁻¹⁰.

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 elite para enfrentar las sepsis por gérmenes con alta virulencia y resistencia.

³ King, D.E. New classifications and update on the quinolones antibiotics. *Am. Fam. Physician.* 61, 2741, 2000

⁴ Oliphant, C.M. Quinolones: A comprehensive review. *Am. Fam. Physician.*, 65, 455, 2002

⁵ O'Donell, J.A. Fluoroquinolones. *Infect. Dis. Clin. North. Am.* 14, 489, 2000

⁶ Lowe M.N. Gemifloxacin. *Drugs.* 59, 1137, 2000

⁷ King, A., Comparative in vitro activity of Gemifloxacin, *J. Antimicrob Chemother*, 45, 1, 2000

⁸ Johnson A.P. *Pazufloxacin Toyana Chemical co.* 1, 52, 2000

⁹ Mikamu, H. *Chemotherapy*, 45, 154, 1999

¹⁰ Kawahara, S. *Kekkaku*, 29, 76, 2001

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, un tanto coincidiendo con su época de aparición y sobre todo con el espectro bacteriano^{3,4}.

Tabla I. 1.- Clasificación química de las quinolonas

1 ^a GENERACIÓN	2 ^a GENERACIÓN	3 ^a GENERACIÓN*	4 ^a GENERACIÓN
Acido nalidíxico	Norfloxacino	Difloxacino	Trovafloxacino*
Acido oxolínico	Enoxacino*	Amifloxacino	Gatifloxacino*
Acido piromídico*	Pefloxacino*	Temafoxacino	Moxifloxacino
Acido pipemídico	Ciprofloxacino	Lomefloxacino	Balofloxacino*
Cinoxacino*	Ofloxacino	Esparfloxacino	Gemifloxacino*
Rosoxacino*	Fleroxacino*	Levofloxacino	Pazufloxacino*
	Lomefloxacino*	Tosufloxacino	
		Clinafloxacino	
		Sarafloxacino	

* No comercializadas en España

1^a 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.

2^a 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 enoxacino, alcanzan buenos niveles séricos, con lo que es posible tratar infecciones sistémicas. Ciprofloxacino, ofloxacino y pefloxacino se pueden administrar tanto por vía oral como parenteral.

3^a 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...) 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.^{1,11}

Estas drogas 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 2).

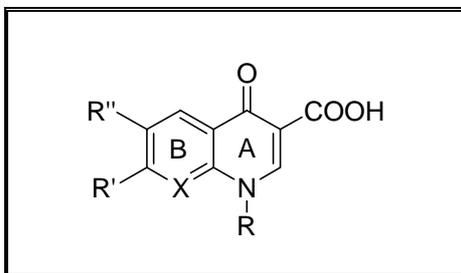


Figura 2. Estructura general de las quinolonas. X= C ó N; R= ciclopropil, etil, fluoroetil, metilamino, fluorofenilo o anillo tiazínico o oxacínico. R¹= piperacino-4-ilo, 3-metilpiperacino-1-ilo; R²= átomo de fluor.

¹¹ Neuman, M. *Vademecum* Ed. Sigma, Roma. 1994

Mecanismo de acción

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

Las bacterias confrontan un gran problema topológico ya que en su gran mayoría miden 2 μm de longitud por 1 μm de ancho, teniendo que contener en su interior un DNA de doble cadena de 1300 μm de longitud, eso lo logra gracias a la acción de la enzima topoisomerasa II, la cual es responsable del enrrollamiento de dichas bandas, manteniendo los cromosomas en un estado de superespiral, fijándolo a la superficie interna de la célula. Además, se encarga de la reparación de pequeñas roturas de filamento de DNA 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 DNA. 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 inhibida las topoisomerasas y quedar sin reparación porciones dañadas del DNA, esto 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), estas 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.^{1,2,11}

Espectro de acción

El espectro se va a comportar de forma similar en todos los miembros de una misma generación y se irá ampliando según avancen estas.

Quinolonas de primera generación; gérmenes sensibles: bacterias Gram negativas (*E. coli*, *Proetus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Salmonella*, *Shigella*) excepto *pseudomonas*.

Quinolonas de segunda generación; gérmenes sensibles: el mismo espectro anterior expandiéndose a *P.aeruginosa*, *N.gonorrhoeae*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, (incluyendo meticillin-resistente), *H. influenzae*, *H. Ducrey*, *M. Catarrhalis* (incluyendo los productores de penicilinasas), gérmenes multirresistentes a cefalosporinas, penicilinas y aminoglucósidos, *V. Cholera*, *Campylobactre*, *Y. Enterocolica*, *Acinetobacter*, *Microbacterias* y algunos patógenos atípicos

Quinolonas de tercera generación; gérmenes sensibles: similar al anterior expandiéndose a bacterias Gram positivas (*estreptococos pyogenes* y *neumococo penicilin-sensible* y *penicilin-resistente*) y atípicas.

Quinolonas de cuarta generación; gérmenes sensibles: similar al anterior expandiéndose a bacterias anaerobias (*clostridium* y *bacteroides*).^{1,2,11,12}

Resistencia

Por su mecanismo de acción (inhibición de la síntesis de DNA), parecía imposible la resistencia codificada por plásmides, sin embargo en 1967 Barbour aisló cepas de *E. coli* resistente al ácido nalidíxico por dicho mecanismo, lo que corroboró más tarde Munshi en 1987 en cepas de *Shigella dysenteriae*.²

¹² Neu , H.C., *Clin. Med. Nort.* 3, 668, 1988

A pesar de estos informes, la resistencia por plásmides frente a estos compuestos es rara, elemento importantísimo en estos momentos, ya que es ese el principal mecanismo de transmisión de resistencia entre cepas bacterianas, incluso de especies diferentes, ante la mayoría de los antimicrobianos (penicilinas, cefalosporinas, macrólidos, aminoglucósidos, etc).

Sin embargo, se han publicado infinidad de estudios sobre resistencia de tipo cromosómica (mutaciones de topoisomerasa) incluso contra las más modernas Quinolonas, eso es preocupante, pues incluyen cepas de *N. gonorrhoeae* *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *Salmonellas*, *Campylobacter*, etc.

Viene siendo relevante el papel de la expulsión activa como mecanismo de resistencia a quinolonas, llegándose a plantear en algunos estudios realizados en *E.coli* y *S. thyphimurium*, que las mutaciones en las topoisomerasas sin la presencia de este mecanismo son insuficientes para producir resistencia significativa.¹³⁻¹⁵

Difusión y excreción

Las Quinolonas de primera generación tienen una baja difusión tisular de ahí que no estén indicadas en sepsis sistémicas, sólo en urinarias y gastrointestinales.

A partir de la segunda generación hubo una mejoría importante respecto a la difusión a órganos y tejidos, lográndose concentraciones terapéuticas en mucosa nasal, epitelio bronquial, aparato digestivo, vesícula biliar, próstata, hueso, piel, hígado, corazón, pulmones y de forma significativa en riñón. La difusión en el líquido cefalorraquídeo esta en dependencia de la lipofilia de las moléculas del compuesto, siendo desde 5-25% para ciprofloxacino hasta 90% de la sparfloxacino.

Una característica muy importante de esta familia de antimicrobianos es su capacidad de penetración intracelular (macrófagos, polimorfonucleares), lo que favorece su acción bactericida sobre los gérmenes intracelulares (*legionellas*, *chlamydias*, *mycoplasmas*, *brucellas*, *micobacterias*, etc).

¹³ Oethinger, M., Kern, W.V., Jellen-Ritter, A.S., McMurry, L.M., Levy, S.B., *Antimicrob. Agent. Chemoter*, 44, 10, 2000

¹⁴ Gutierrez, J.A., *Revista Española Salud Pública*, 75, 313, 2001

¹⁵ Ruiz, M., *Rev. Esp. Quimioter*, 12, 366, 1999

Presentan una amplia biodisponibilidad por vía oral, siendo desde 70% el ciprofloxacino hasta casi un 100% con ofloxacino, lomefloxacino, fleroxacino y pefloxacino. Esto facilita su aplicación ambulatoria, la continuidad de la terapia parenteral-oral, cursos prolongados de tratamiento y el cumplimiento del paciente.

La excreción es fundamentalmente renal, tanto por filtrado glomerular como por secreción tubular, no obstante existente diferencias individuales.

El ciprofloxacino presenta una eliminación a través de las células intestinales que llega a ser del 20-30% de la dosis administrada, al igual que el norfloxacino y fleroxacino, de ahí su gran efectividad sobre las infecciones intestinales.^{1,2,11,12}

Características farmacocinéticas

En general las nuevas quinolonas se unen a proteínas plasmáticas en un bajo porcentaje, inferior al 50 %. Difunden ampliamente alcanzando concentraciones altas en tejidos periféricos y fluidos orgánicos (esputo, pulmón, piel, huesos, líquido articular, riñón, próstata, bilis, etc.) con un volumen de distribución que oscila entre 1 y 3 l/kg. El volumen de distribución es máximo en el caso del ciprofloxacino, llegando a 3 l/Kg; en el caso del enoxacino y del perfloxacino varía entre 1,3 y 1,9 l/Kg.

La excreción es fundamentalmente renal, tanto por filtración glomerular como secreción tubular. El porcentaje de la dosis administrada que se elimina por la orina inalterada es variable y lo mismo sucede con el porcentaje de fármaco que se metaboliza en el hígado.

Tabla I. 2. Farmacocinética de los analitos

		Enoxacino	Norfloxacino	Ofloxacino	Ciprofloxacino	Enrofloxacino*
Dosificación (adultos)		200 - 400 mg c/12 h	400 mg c/12 h	200 - 400 mg c/12 h	250 - 750 mg c/12 h	
Fracción de adsorción (%)		75-80	35-45	85-95	97-100	97-100
Semivida (h)		5	4	7	3,9	
Unión a proteínas (%)		40-50	14	8-30		
Vd (l/Kg)		1,7-2	1,7-2	1,3-1,8		
Eliminación	Orina (%)	65-72	30-50	70-90		
	Heces (%)	18	30	4		

* Sólo uso veterinario

La semivida de eliminación varía, oscilando para las fluoroquinolonas entre 4 y 14 horas; para el ciprofloxacino, el ofloxacino, el norfloxacino y el enoxacino es de 5-7 horas, mientras que para el perfloxacino alcanza unas 12 horas aproximadamente. Las fluoroquinolonas son poco dializables. La insuficiencia renal prolonga la semivida de eliminación, siendo necesario en ocasiones reducir la dosis o ampliar el intervalo de administración.

Concentraciones habituales en fluidos biológicos¹⁶

Fluido	Enoxacino	Norfloxacino	Ofloxacino	Ciprofloxacino
Orina	250 mg/L	157 mg/L	200-400 mg/L	237 mg/L
Suero	≤ 2.0 mg/L	≤ 1.26 mg/L	1-7 mg/L	≤ 2.0 mg/L

Interacciones con otros principios activos

¹⁶ Well M.; Naber, KG.; Kinzig-Schippers, M.; Sörgel F.; *Antimicrobial Agents*, 10, 31, 1998

En cuanto a las interacciones, se han descrito numerosas entre quinolonas y otros fármacos, existiendo diferencias significativas entre los diferentes derivados: a) el enoxacino, el ciprofloxacino y perfloxacino reducen el aclaramiento de teofilina entre un 20 y un 50%, aumentando en consecuencia sus niveles plasmáticos y su toxicidad; sin embargo el norfloxacino, el ofloxacino y el ácido nalidíxico no producen este efecto; b) el enoxacino reduce también el aclaramiento de cafeína, warfarina y antipirina, y c) aunque no existen datos concluyentes sobre la interacción ciclosporina-fluoroquinolonas, se ha descrito un aumento en los niveles plasmáticos de ciclosporina tras la administración simultánea de ciprofloxacino.

Efectos adversos

El efecto adverso más conocido y temido de las quinolonas, que incluso las contraindica en los pacientes menores de 18 años, así como en el embarazo y la lactancia, es la erosión del cartílago articular en crecimiento en articulaciones que soportan peso. Este efecto se ha observado en animales (perros inmaduros) tratados con dosis 6 veces mayores que la utilizada en el hombre.

Hasta el momento, por su alta efectividad frente a *pseudomona* y *stafilococo* y por su facilidad de administración por vía oral, teniendo en cuenta la relación riesgo/beneficio, las quinolonas, específicamente ciprofloxacino, han sido utilizadas en más de 10,000 niños, incluyendo recién nacidos, muchos de ellos portadores de fibrosis quística, no informándose ninguna artropatía relacionada con el tratamiento.

Pueden aparecer una serie de efectos similares al resto de los antimicrobianos; náuseas, vómitos, diarreas, erupciones cutáneas, prurito, exantema, fotosensibilidad, etc.

Un efecto adverso observado con las quinolonas más modernas (levofloxacino, moxifloxacino, fleroxifloxacino, trovafloxacino), que provocó la salida del mercado de grepafloxacino, es la prolongación del intervalo QT lo cual puede conllevar a la aparición de arritmias peligrosas. Por tal motivo no deben ser aplicadas en pacientes medicados con antiarrítmicos o antecedentes de arritmias peligrosas.

También fueron informados, en 1999 (FDA) 14 casos de insuficiencia hepática aguda por trovafloxacino, recomendándose su utilización valorando riesgo/beneficio.

Este medicamento ha sido retirado del mercado europeo, estando disponible únicamente en EE.UU, México y Canadá.

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 las infecciones urinarias complicadas y no complicadas.

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

Pueden ser utilizadas en monodosis (ciprofloxacino 500 mg vía oral) en el tratamiento de la uretritis y cervicitis gonocócica.

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

Importante su papel en las infecciones respiratorias por su excelente penetración en las secreciones bronquiales y su acción sobre bacterias Gram negativas.

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

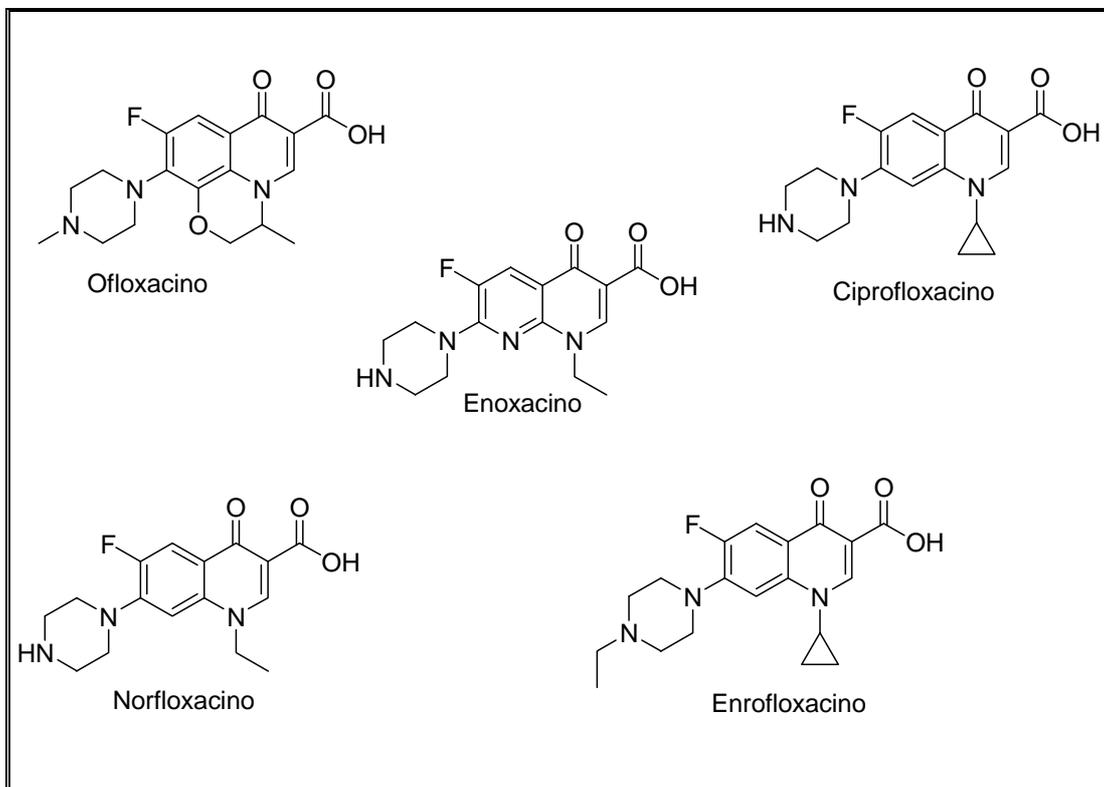
Muy utilizadas y efectivas en las infecciones respiratorias altas (*sinusitis, otitis*), sobre todo en la otitis externa maligna del diabético, por la participación de *P. aeruginosa*.

Efectivas en las infecciones biliares, de piel y tejidos blandos y gastrointestinales (*cólera, diarrea del viajero, disenterias, fiebre tifoidea*).

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*).

En este trabajo de investigación, se han llevado a cabo el estudio de cinco quinolonas; *norfloxacino, ofloxacino, enoxacino, ciprofloxacino* y *enrofloxacino* todas ellas englobadas en las denominadas de segunda generación.



El norfloxacinó fue la primera quinolóna antibacteriana encontrada¹⁷, 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 y Gram-negativos, incluyendo a las *Pseudomonas aeruginosa*.

El ofloxacinó fue sintetizada por Hayakawa y col¹⁸. Es efectiva para el tratamiento de una gran variedad de infecciones crónicas, tales como las que aparecen el tracto urinario, respiratorio y osteomielitis.

2. Revisión bibliográfica

El mayor número de referencias bibliográficas relativas a la determinación cuantitativa de estos principios activos corresponden a métodos basados en cromatografía líquida. Para ello en primer lugar haremos un estudio sobre las publicaciones existentes acerca del análisis cromatográficos de los analitos objetos de estudio.

En la Tabla I.3 se muestran los principios activos estudiados, así como una reseña al método cromatográfico y el sistema detector empleado. Las citas se han organizado en orden cronológico, en cuanto al año de aparición.

¹⁷ Anargiros I; Drakopoulos, Pinelopi C. Ioannou. *Analytical Chimica Acta*. 354, 197, 1997

¹⁸ Cordiés Jackson. *Acta médica* . 8, 58, 1998

Tabla I. 3. Reseñas bibliográficas en las que se ha utilizado una etapa cromatográfica

Análitos	Procedimiento cromatográfico	Detección	Medio	Año	Ref.
norfloxacino, enoxacino ofloxacino	Extracción de las drogas con cloroformo, disolución en la fase móvil. Separadas mediante HPLC Nucleosil C-18	Fotométrica 0.5 – 7.0 µg/mL	Suero humano	1986	19
norfloxacino ciprofloxacino	Determinación mediante HPLC micro Bondpak C-18	Fluorimétrica 456 nm 0.125 – 20 µg/mL	Suero y orina humano	1986	20
norfloxacino	El tejido y suero se limpian mediante columna Carboapak B. Posteriormente el eluato se hace pasar a través de una columna Partisil PXS C8	Fluorimétrica a 420 nm 5 – 1500 µg/mL	Plasma y tejido humano	1987	21
enoxacino	HPLC en micro Bondapak C-18		Suero humano y tejido prostático	1988	22
enoxacino (fenbufen + felbinac)	Cromatografía de fase inversa Chemcosorb 5-ODS-H	Fotométrica a 275 nm 0 – 20 µg/mL	Plasma de rata	1989	23
norfloxacino, enoxacino ofloxacino	Columna LiChrosorb RP-18	Fluorimétrica 340-275 nm	Fluidos biológicos	1989	24
ofloxacino	Microcolumna TSK ODS-80 TM	Determinación fluorimétrica a 460 nm, excitación a 290 nm	Fluido bronco-alveolar	1989	25
enoxacino ciprofloxacino (Patrón interno)	Primero separación mediante HPLC y seguidamente paso del eluyente por cartucho Bond-Elut SCX	Fotométrica a 340 nm	Plasma y orina humanos	1991	26
enoxacino	Pre-columna Develisuk pH 5 y columna Develosil ODS-5	Fotométrica 300 nm R = 88.8 – 101.7 %	Plasma humano	1991	27
norfloxacino trimethoprim	Columna de YMC-Pack ODS	Fotométrica a 280 nm ~ 100 %	Fármaco	1992	28
norfloxacino,	HPLC	Potenciométrica	Muestras	1992	

¹⁹ Groeneveld, AJN; Brouwers, JRBJ. *Pharma-Weekbl.* 8, 84, 1986

²⁰ Morton, SJ; Shull, VH; Dick, JD. *Journal Antimicrob-Agents.Chemother.* 30, 325, 1986

²¹ Lagana, A; Curini, R; D'Ascenzo, G; Marino, A; Rotatori, -M. . *Journal of Chromatography: -Biomedical-Applications.* 61, 135, 1987

²² White, LO; Bowyer, HM; McMullin, CH; Desai, K. *Journal Antimicrob Chemother.* 21, 512, 1988

²³ Yoshihiro, K; Kohji, N; Noburhiro, I, Masakazu, H; kikuo, I. *Boyojin-Yakugaku.* 15, 292, 1989

²⁴ Chan, CY; Lam, AW; French, GL. *Journal Antimicrob Cemother.* 23, 597, 1989

²⁵ Matsubayashi, K; Une, T; Osada, Y. *Journal of Chromatography, Biomedical Applications.* 87, 354, 1989

²⁶ Goebel, KJ; Stolz, H; Ehret, I; Nussbaum, W. *Journal of liquid Chromatography.* 14, 733, 1991

²⁷ Ohkubo, T; Kudo, M; Sugawara, K. *Journal of Chromatography, -B: -Biomedical-Applications.* 573, 289, 1992

²⁸ Zhao, L, Chan, Y; Dai, -Q; Yang, Q. *Zhongguo Yaoke Daxue Xuebao.* 23, 127, 1992

ciprofloxacino enoxacino pefloxacino enrofloxacino ofloxacino			sintéticas		29
enoxacino	Columna 10-micro m YMG-C18	Fotométrica a 254 nm R = 100.6 %	Pomada	1993	30
norfloxacino furprofeno	Columna intercambiadora aniónica Vydac	Fotométrica a 278 nm Tiempo análisis 10 min.	Plasma de rata	1993	31
ofloxacino pefloxacino (Patrón interno)	HPLC	Fluorimétrica a 500 nm L.D. = 1 ng/mL	Plasma y tejido de pulmón	1994	32
norfloxacino	Cartucho C18 de micropartícula	Fotométrica a 279 nm R = 70 %	Suero humano	1995	33
norfloxacino enoxacino (Patrón interno)	HPLC columna micro Zorbax C8	Fluorimétrica a 418 nm R = 86.3 – 90.5 %	Sangre humana	1995	34
enoxacino teofilina ciprofloxacino difloxacino (Patrón interno)	Bondapack C-18	Fotométrica a 268 nm 882.8 – 80.7 % Teofilina 67.8 – 78.1 % CIPRO 57.5 – 79.9 % ENO	Suero y saliva humana	1995	35
ofloxacino enoxacino (Patrón interno)	Columna 7 micro m Separon SGX C- 18	Fluorimétrica a 450 nm L.D. 8 ng/mL	Plasma	1995	36
norfloxacino tinidazol	Columna C-18	Fotométrica a 275 nm	Prepara. farma.	1996	37
ofloxacino ác.piperamídico (Patrón interno)	Columna 4 micro Novapak C18	Fluorimétrica a 500 nm	Fluidos humanos	1997	38
norfloxacino ofloxacino pefloxacino ciprofloxacino	Revisión de métodos HPLC	Review	Fluidos biológicos	1998	39

²⁹ Jain, R; Jain, CL. *Liquid Chromatography Gas Chromatography*. 10, 707, 1992

³⁰ Cao, HP; Liu, Wz. *Yaowu-Fenxi-Zazhi*. 13, 181, 1993

³¹ Carlucci, G; Mazzeo, P; Palumbo, G. *Biomedical Chromatography*. 7, 126, 1993

³² Fabre, D, Bressolle, F, Kinowski, JM, Bouvet, O; Pagnini, F; Galtier, -M. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 12, 1463, 1995

³³ Wallis, SC; Charles, BG; Gahan, LR. *Journal of Chromatography, -B: -Biomedical-Applications*. 674, 306, 1995

³⁴ Hussain, MS; Chukwumaeze-Obiajumwa, V; Micetich, -RG. *Journal of Chromatography, -B: -Biomedical-Applications*. 663, 379, 1995

³⁵ Zhai, SP; Korrapati, MR; Wei, XX; Muppalla, -S; Vestal, -RE. *Journal of Chromatography, -B: -Biomedical-Applications*. 669, 372, 1995

³⁶ Macek, J; Ptacek, P. *Journal of Chromatography, -B: -Biomedical-Applications*. 673, 316, 1995

³⁷ Ghosh, SK; Banarjee, M. *Indian Drugs*. 33, 127, 1996

³⁸ Basci, N. E., Hanioglu-Kargi, S., Soysal, H., Bozkurt, A., Kayaalp, S.O, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 15, 663, 1997

³⁹ Carlucci, G. *Journal of Chromatography, -A*. 812, 343, 1998

norfloxacino enoxacino ofloxacino	Resina Bio-Rad AGMP-1,	Fluorimétrica	Alimentos	1998	40
norfloxacino ác. metalónico (Patrón interno)	Columna C-18 Bondapak	Fotométrica a 278 nm R= 97.9 %	Plasma humano	1998	41
norfloxacino	Columna C-18 Bondapak	Fluorimétrica Exc. 300 nm y Em. 450 nm	Plasma humano	1998	42
norfloxacino	Estudio de la fotodegradación del fármaco. Método HPLC	Espectrofotométrica y fluorimétrica	Muestra sintética	1998	43
enoxacino pefloxacino (Patrón interno)	Columna 5 micro m C-18 Nucleosil	Detección a 340 nm R = 94 – 108 %	Plasma y tejido prostático humano	1998	44
ofloxacino ciprofloxacino	Columna micro Alltech Adsorbosphere HS C18 7U	Fotométrica a 280 nm	Medio de cultivo	1998	45
ofloxacino pefloxacino lomefloxacino	Columna micro-Bondpak C18	No indicado R ~ 100	Prepar. farma.	1998	46
norfloxacino	Columna micro Nucleosil 3C18 a 40°C	Fluorimétrica Ex. 300 nm y Em. 450 nm	Plasma y orina humana	1998	47
norfloxacino trimethoprim	HPLC	Fluorimétrica Ex. 380 y Em. 410 nm	Preparación farmacéutica	1999	48
ofloxacino	Columna Wakosil-II 5 C18	Electroquímica 1.99V R 66 – 102 %	Pollo	1999	49
norfloxacino	Microcolumna Shim-pack ODS a 35°C	Fluorimétrico a 380 y 410 nm	Preparado farmacéutico	1999	50
norfloxacino y otras	Extracción previa, evaporación del disolvente y redisolución del analito	Fluorimétrica R = 99.8 %	Huevo	2000	51
norfloxacino ciprofloxacino danofloxacino enrofloxacino	HPLC en fase inversa con extracción en fase sólida	Fotodiodo-array	Tejido animal	2000	52

⁴⁰ Rose, M.D., Bygrave, J., Stubbings, G.W.F., *Analyst*, 123, 2789, 1998

⁴¹ Li, By; Wang, C; Song, TB; Li, -SF; Xu, LQ; Zhang, -Z; An, TT. *Yaowu-Fenxi-Zazhi*. 18, 323, 1998

⁴² Mascher, HK; Kikuta, C. *Journal of Chromatography*, -A. 812, 381, 1998

⁴³ Cordoba-Diaz, M; Cordoba-Borrego, M, Cordoba-Diaz, -D. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 18, 865, 1998

⁴⁴ Hamel, B; Audran, M; Costa, P; Bressolle, F. *Journal of Chromatography*, -A. 812, 369, 1998

⁴⁵ Wright, DH, Herman, VK, Konstantinides, FN, Rotschafer, JC. *Journal of Chromatography*, -B: -Biomedical-Applications. 709, 97, 1998

⁴⁶ Shinde, VM; Desai, BS; Tendolkar, NM. *Indian Drugs*. 35, 715, 1998

⁴⁷ Mascher, HJ, Kikuta, C. *Journal of Chromatography*, -A. 812, 381, 1998

⁴⁸ Gao, JH; Lin, P; Chen, B. *Fenxi-Shiyanshi*. 18, 37, 1999

⁴⁹ Suzuki, K; Aoki, Y; Kido, Y; Tsuji, A; Ito, K; Maeda, M. *Shokuhin-Eiseigaku-Zasshi*. 40, 23, 1999

⁵⁰ Hong, JW; Liu, YW; Luo, YY. *Fenxi-Ceshi-Xuebao*. 18, 62, 1999

⁵¹ Schneider, MJ; Donoghue, DJ. *Journal of AOAC International*. 83, 1306, 2000

⁵² Gigosos, PG; Revesado, PR; Cadahia, O; Fente, CA; Vazquez, BI; Franco, CM; Cepeda, A. . *Journal of Chromatography*, -A. 871, 31, 2000

norfloxacino, ofloxacino enoxacino ciprofloxacino	Columna Shim-pack CLS-ODS a 40°C	Fotométrica a 294 nm R = 76.1 – 112.6 %	Prepar. farma.	2000	53
norfloxacino danofloxacino difloxacino	Columna C-18 Silica. Separación Isocrática	Detección fluorimétrica	Prepar. farma.	2000	54
norfloxacino, enoxacino ofloxacino ciprofloxacino lomefloxacino	Análisis SPE-HPLC	Review	Fluidos corporales	2001	55
norfloxacino ofloxacino fleroxacino pefloxacino ác. iperamídico	TLC en Silica gel GF254	UV a 274 nm Fines indentificativo	Prepar. farma.	2001	56
ofloxacino	Extracción preliminar seguida de separación SPE	A 295 nm R = 80 -100 %	Tejido de hígado de pollo	2001	57
norfloxacino enoxacino ofloxacino ciprofloxacino pefloxacino	Separación mediante cromatografía en capa fina en dos pasos	Densidad de fluorescencia	Plasma y orina	2001	58
ciprofloxacino enrofloxacino sarafloxacino difloxacino	Eliminación de las proteínas del suero mediante una precolumna. Separación de los analitos mediante HPIAC	Detección fluorimétrica. (280 – 444 nm)	Plasma y suero bovino	2001	59
ciprofloxacino enrofloxacino sarafloxacino	Cromatografía en fase inversa	Fluorimétrica	Huevo	2002	60
ciprofloxacino levofloxacino gatifloxacino cinoxacino moxifloxacino	Columna: C18	Fluorimétrica UV-visible	Plasma humano	2002	61

⁵³ Liang, P; Qin, YC; Jiang, ZC; Xiong, CM. *Fenxi-Shiyanshi*. 19, 56, 2000

⁵⁴ Hernancez-Arteseros, JA; Boronat, I; Compano, R; Prat, MD. *Chromatographia*. 52, 295, 2000

⁵⁵ Kudo, M; Ohkubo, T; Sugawara, K. *Yakuagku-Zasshi*. 121, 319, 2001

⁵⁶ Niu, YJ; Zhang, SX. *Yaowu-Fenxi.Zazhi*. 21, 204, 2001

⁵⁷ Maraschiello, C ; Cusido, E ; Abellan, M ; Vilageliu, J. *Journal of Chromatography, -B: - Biomedical-Applications*. 754, 311, 2001

⁵⁸ Wang, PL; Chen, L; Fan, YF. *Journal of AOAC International*. 83, 684, 2001

⁵⁹ Holtzapple, CK ; Buckley, SA ; Stanker, -LH. *Journal of Chromatography -B: Biomedical applications*. 754, 1, 2001

⁶⁰ Chus, PS.; Wang, RC.; Chu, HF.; *Journal of agricultural and food chemistry*. 50, 4452, 2002

⁶¹ Liang, HR.; Kays, MB.; Sowinski, KM.; *Journal of chromatography B*. 772, 53, 2002

quinolonas fluoroquinolona	Cromatografía en fase inversa con proceso previo de separación en fase sólida	MS	Peces	2002	62
ciprofloxacino norfloxacino ofloxacino y otros	Columna: Chira Dex Fase móvil: acetonitrilo/metanol/Britton Robison (73:7:20) pH 5.7	Fluorimétrica	Suero humano	2003	63
enrofloxacino ciprofloxacino	Separación por diálisis difásica y posterior purificación	MS	Huevo	2003	64
floxacin sparfloxacino	Columna: Sílice Fase móvil: metanol/acético-acetato pH 2.8	Fluorimétrica	Suero humano	2003	65
norfloxacino ofloxacino ciprofloxacino lomefloxacino pefloxacino	Columna: Chira Dex Fase móvil: acetonitrilo/buffer mixto/metanol (78:20:7)	Fluorimétrica	Suero humano	2003	66
enoxacino norfloxacino ofloxacino ciprofloxacino	Columna: Kromasil C8 Fase móvil: acetonitrilo/metanol/ácido cítrico (7:15:78)	UV-visible 275nm	Fármacos y suero humano	2003	67
ciprofloxacino enoxacino ofloxacino enrofloxacino otras	Columna: C5 (15 cm x 4.6 mm) Extracción previa con ácido metafosfórico y acetonitrilo	UV-visible Fluorimétrico	Tejido animal	2003	68

Se realizó la revisión bibliográfica, de los artículos existentes en cuanto a la determinación simultánea de estos analitos, sin etapa separativa previa. El resultado fue poco fructífero, ya que en prácticamente la totalidad de los procedimientos de análisis descrito, se llevan a cabo mediante una etapa previa o intermedia, de separación cromatográfica.

En la tabla 1.4, se recoge el resto de artículos, en los que no es utilizada la técnica cromatográfica, se trata en su mayor parte de métodos para análisis de componentes simples mediante técnicas espectrofotométricas o espectrofluorimétricas, que en algunos casos han sido semiautomatizadas mediante montajes tipo FIA.

⁶² Jonhston, L.; Mackay, L; Croft, M.; *J. of chromatography A.*; 982, 97, 2002

⁶³ Du, LM., Wei, HQ.; Zhang, JY.; Zhang, QP.; *Sepu*, 21, 503, 2003

⁶⁴ Lolo, M.; Pedreira, S.; Fente, C; Vazquez, BL.; Franco, CM.; Cepeda, A.; *Analytical Chimica Acta.* 480, 123, 2003

⁶⁵ Kowalczyk, D.; Hopkaa, H; Gumieniczek, A.; *Journal of Liquid Chromatography and related Technologies*, 26, 1731, 2003

⁶⁶ Du, LM., Wei, HQ.; Zhang, JY.; Zhang, QP.; *Fenxi Huaxue*, 31, 637, 2003

⁶⁷ Samanidou, VF.; Demetriou, CE.; Papadoyanis, IN.; *Analytical and Bioanalytical chemistry.* 375, 623, 2003

⁶⁸ Pecorelli, I.; Calarini, R.; Bibi, R.; Floridi, A.; Casciarri, E. *Analytical Chimica Acta.* 483, 81, 2003

Tabla I. 4. Reseñas bibliográficas en las que no se ha utilizado una etapa cromatográfica.

Analito	Matriz	Método	Detección	Año	Ref
norfloxacino	Preparado Farmacéutico	FIA. Formación de complejo coloreado con Fe (III)	Espectrofotométrico	1993	69
norfloxacino	Preparado Farmacéutico	Formación de complejo iónico	Espectrofotométrico	1995	70
norfloxacino	Preparado Farmacéutico	Reacción de la droga con donores π aceptores	Espectrofotométrico	1995	71
norfloxacino	Preparado	Determinación mediante técnica cinética (FIA)	Fluorescencia sensibilizada por lantánidos	1995	72
ofloxacino, norfloxacino y otras	Preparado	Formación de complejo con Sc^{3+}	Fluorimétrica	1997	73
Norfloxacino	Muestras reales	Formación de complejo fluorescente con Al^{3+}	Fluorimétrica	1997	74
Quinolonas	Suero	Utilización de terbio como agente sensibilizador de fluorescencia	Fluorescencia sensibilizada	1997	75
Norfloxacino	Preparado farmacéutico	Efecto que ejerce sobre la fluorescencia diferentes metales	Espectrofotometría y fluorimetría	1998	76
Norfloxacino, ofloxacino	Preparado	Formación de complejos de Ce y Ru. Utilización de sistema FIA	Quimiluminiscencia	2001	77
enoxacino ofloxacino	Preparado farmacéutico	Reacción con permanganato potásico y sulfito de sodio. Sistema FIA	Quimiluminiscencia	2003	78

⁶⁹ Sultan, SM; Sluiman, FEO. *Analyst*. 118, 573, 1993

⁷⁰ Sastry, CSP; Rama-Rao, K; Prased, DS. *Talanta*. 42, 311, 1995

⁷¹ Amin, AS; El-Sayed, GO; Issa, YM. *Analyst*. 120, 1189, 1995

⁷² Panadero, S; Gómez-Hens, A; Pérez-Bendito, A.; *Analytica Chimica Acta*. 303, 39, 1995

⁷³ Drakopoulos, AI; Ioannou, PC; *Analytica Chimica Acta*. 354, 197, 1997

⁷⁴ Perez Ruiz; T; Martínez Lozano, C; Tomás, V; Carpena, J. *Analyst*. 122, 705, 1997

⁷⁵ Veiopoulou, CJ; Ioannou, PC; Lianidou, ES. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 15, 1839, 1997

⁷⁶ Cordoba-Diaz, M; Cordoba-Borrego, M; Córdoba-Diaz, D. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 18, 565, 1998

⁷⁷ Fatma A. Aly; Salma A.; Abdulrahman A. *Talanta* 53, 885, 2000

⁷⁸ Yi, L.; Zhao, HC.; Chen, SL.; Jin, LP.; Zheng, DD.; Wu, ZL.; *Talanta*, 61, 403, 2003

En cuanto a la aplicación de métodos de determinación simultánea sin separación previa se ha encontrado una referencia a la determinación de ofloxacino en formulaciones farmacéuticas mediante espectrofotometría de derivadas⁷⁹.

Sin embargo, son muy escasas las referencias bibliográficas sobre la aplicación de métodos de calibración multicomponente basados en análisis multivariante, y los que aparecen lo son de análisis de quinolonas. Así, Rodríguez Cáceres y col. desarrollan métodos para la resolución de la mezcla nalidíxico y 7-hidroxi metilnalidíxico, mediante métodos quimiométricos tales como CLS, PLS, PCR y redes neuronales artificiales, aplicando diferentes técnicas tales como fluorescencia molecular⁸⁰ y DS Sampled, DPP y SWV⁸¹.

Recientemente Martínez Cañas⁸² desarrolla un método para el análisis simultáneo en orinas mediante la técnica de redisolución adsortiva de onda cuadrada y diferentes modelos de calibración multivariante, CLS, PCR, PLS y redes neuronales artificiales, para el análisis de ácido nalidíxico y 7-hidroxi metilnalidíxico

Los datos bibliográficos referentes a la determinación simultánea de fluoroquinolonas mediante calibración multivariante se resumen en la Tabla I.5.

Tabla I. 5.- Reseñas bibliográficas de trabajos en los que se han realizado calibración multivariante

Analito	Metodología	Detección	Muestra	Año	Ref.
ciprofloxacino sarafloxacino	PLS Separación previa con CZE	UV-visible	Tejido animal	2004	83
ciprofloxacino enrofloxacino	Regresión por componentes principales Reacción de la quinolona con terbio (III)	Luminiscencia	Tejido animal	2000	84
ciprofloxacino	Comparación de los algoritmos PARAFAC y BLS	Fluorescencia Matrices de EEM	Suero humano	2004	85

⁷⁹ Carlucci, G; Mazzeo, P; Fantozzi, T. *Analytical Letters*. 26,2193,1993

⁸⁰ Duran Merás, I., Muñoz de la Peña, A., Rodríguez Cáceres, M.I., Salinas López, F. *Talanta*, 45, 899, 1998

⁸¹ Guiberteau Cabanillas, A., Galeano Díaz, T., Rodríguez Cáceres M.I., Ortiz Burguillos, J.M., Durán Merás, I., Salinas, F. *Talanta*, 62, 357, 2004.

⁸² Martínez Cañas, M.A., *Trabajo de Grado: "Estudio voltamperométrico mediante redisolución adsortiva de onda cuadrada de los ácidos nalidíxico, y 7-hidroxi metilnalidíxico. Resolución conjunta mediante métodos quimiométricos"*. 2002

⁸³ Beltran, J.L.; Jiménez Lozano, E.; Barrón, D.; Barbosa, J.; *Analytica Chimica Acta*, 501, 137, 2004

⁸⁴ Hernandez-Arteseros, JA.; Compano, R.; Ferrer, R.; Part, MD.; *Analyst*, 125, 1155, 2000

⁸⁵ Daminani, PC.; Nepote, AJ.; Bearzotti, M.; Olivieri, AC.; *Analytical Chemistry*, 76, 2798, 2004

3. Aparatos y reactivos utilizados en el desarrollo de la memoria

Aparatos

- pH-metro Crison, modelo 2001, con sensibilidad de ± 0.01 unidades de pH, provisto de electrodo de vidrio y de calomelanos saturado.
- Balanza Scaltec, modelo SBA 33, con sensibilidad de ± 0.1 mg.
- Baño de ultrasonidos, P. Selecta.
- Sistema de obtención de agua ultrapura Milli-Q (módulos RIOs/elix y Milli-Q).
- Bomba Dinko, modelo D-95.
- Centrífuga Selecta, modelo Angular 6.
- Centrífuga Selecta, modelo Mixtasel.
- Espectrofotómetro UV-visible Milton Roy, modelo Spectronic 3000 con detección diode array, microordenador PC 386 incorporado y software propio Rapidsan.
- Espectrofotómetro de luminiscencia SLM Aminco Bowman Series 2, equipado con dos lámparas de descarga de Xe, una continua de 150 W y otra de pulsos de 7 W. Está acoplado mediante una tarjeta GPIB (IEE-488) a un microordenador PC.
- Ultratermostato Selecta Mod. Frigiterm, capaz de regular la temperatura entre -10 °C y 100 °C, con una precisión de ± 0.1 °C. Este equipo se conectó al soporte de la cubeta en el espectrofluorímetro SLM Aminco.
- Fotoreactor constituido por lámpara de mercurio OSRAM 200 W, un adaptador energético Oriel modelo 8500 y carcasa de metálica.
- Cromatógrafo Hewlett-Packard HPLC Mod. 1100, equipado con desgasificador, bomba cuaternaria, válvula de inyección de 6 vías, bucle de 20 μ L y detector fluorimétrico. 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).
- Membranas de nylon de tamaño de poro de 0.45 μ m (Agilent, USA).

Reactivos

Disoluciones reguladoras y disoluciones de tensoactivos

- Disolución reguladora de pH 4.0 preparada a partir de acetato de sodio y ácido acético (PANREAC) siendo su concentración final total de 0.5 M.
- Disolución reguladora de pH 7.4 preparada a partir de Tris-hidroximetilaminometano-HCl (Tris-HCl) de pH 6.70. Preparada por dilución de Tris-hidroximetilaminometano (SIGMA) y ajustando el pH con HCl (SCHARLAU), siendo su concentración final total de 0.5 M.
- Disolución reguladora de pH 3.0 preparada a partir de di-potasio hidrogenofosfato trihidrato (MERCK) ajustando el pH con HCl (SCHARLAU). Concentración final total de 30.0 mM.
- Disolución de SDS de concentración 0.100 M, preparada por pesada de de SDS y su disolución en agua.

Disoluciones estándar

- Disolución de enoxacino 100 µg/mL; preparada por pesada de 0.0100 g de enoxacino (SIGMA) y dilución hasta 100.0 mL con etanol (MERCK).
- Disolución de norfloxacin 100 µg/mL; preparada por pesada de 0.0100 g de norfloxacin (SIGMA) y dilución hasta 100.0 mL con etanol (MERCK).
- Disolución de ofloxacin 100 µg/mL; preparada por pesada de 0.0100 g de ofloxacin (SIGMA) y dilución hasta 100.0 mL con etanol (MERCK).
- Disolución de enrofloxacin 100 µg/mL; preparada por pesada de 0.0100 g de enrofloxacin (SIGMA) y dilución hasta 100.0 mL con etanol (MERCK).
- Disolución de ciprofloxacino 50 µg/mL; preparada por pesada de 0.0050 g de ciprofloxacino (FLUKA) y dilución hasta 100.0 mL con etanol (MERCK).
- Disolución de carbamacepina 2000 µg/mL; preparada por pesada de 0.2000 g de carbamacepina (Laboratorio productor de fármacos medicinales, Santa Fe, Argentina) y dilución hasta 100.0 mL con metanol.

- Disolución de carbamacepina 10,11 epóxido 2000 µg/mL; preparada por pesada de 0.2000 g de carbamacepina 10,11 epóxido (Sintetizado a partir de la carbamacepina) y dilución hasta 100.0 mL con metanol.

Disolventes orgánicos utilizados en HPLC

- Acetonitrilo grado gradiente para cromatografía líquida de alta eficacia (MERCK)
- Metanol grado gradiente para cromatografía líquida de alta eficacia (MERCK)
- Tetrahidrofurano grado gradiente para cromatografía líquida de alta eficacia (MERCK)

Programas informáticos

- Grapher 3.0, 2-D Graphing system. Golden Software Inc. Colorado, USA. 2001
- Surfer, Surface Mapping System. Golden Software Inc. Colorado, USA. 2001
- Multivar 7.0: **“MULTIVAR. A program for multivariate calibration incorporating net analyte signal calculations”** (*Trends in Analytical Chemistry, Volume 19, Issue 10, October 2000, Pages 599-605* Héctor C. Goicoechea and Alejandro C. Olivieri)
- MATLAB 5.3 Rev.11; *The MathWorks Inc.: Natick, M.A.; 1999*
- MVC1: **“MVC1: an integrated MatLab toolbox for first-order multivariate calibration”** (*Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, Volume 73, Issue 2, 28 October 2004, Pages 189-197* Alejandro C. Olivieri, Héctor C. Goicoechea and Fernando A. Iñón)
- MVC2, A. C. Olivieri, Rosario, Argentina
- ACOC: **“Univariate linear regression calibration software in MATLAB environment. Application to the laboratory practices by chemistry Students”** (*Desarrollado en esta memoria. Enviado a The chemical educator*)

- AMINCO-Bowman (AB2) Spectrofluorometer Software versión 5.0. Spectronic Unicam, 2000. Rochester, New York.
- Hewlett Packard ChemStation Chromatography Software. HP ChemStation Family Software Products, Hewlett Packard Co. 1997

Capítulo II.

Estudio de las propiedades fluorescentes de norfloxacinó, enoxacinó, ofloxacinó, ciprofloxacino y enrofloxacinó en disolución.

1. Estudios de las propiedades analíticas del norfloxacino

Estudios fluorimétricos

Comportamiento frente a diferentes disolventes

Con objeto de determinar las características fluorescentes del analito, se procede a registrar espectros de excitación y emisión fluorescente, en diferentes disolventes. Los disolventes utilizados son agua, etanol, metanol, acetona y acetonitrilo. En la Figura II. 1 podemos ver los correspondientes espectros de emisión y excitación para el norfloxacino, utilizando diferentes disolventes

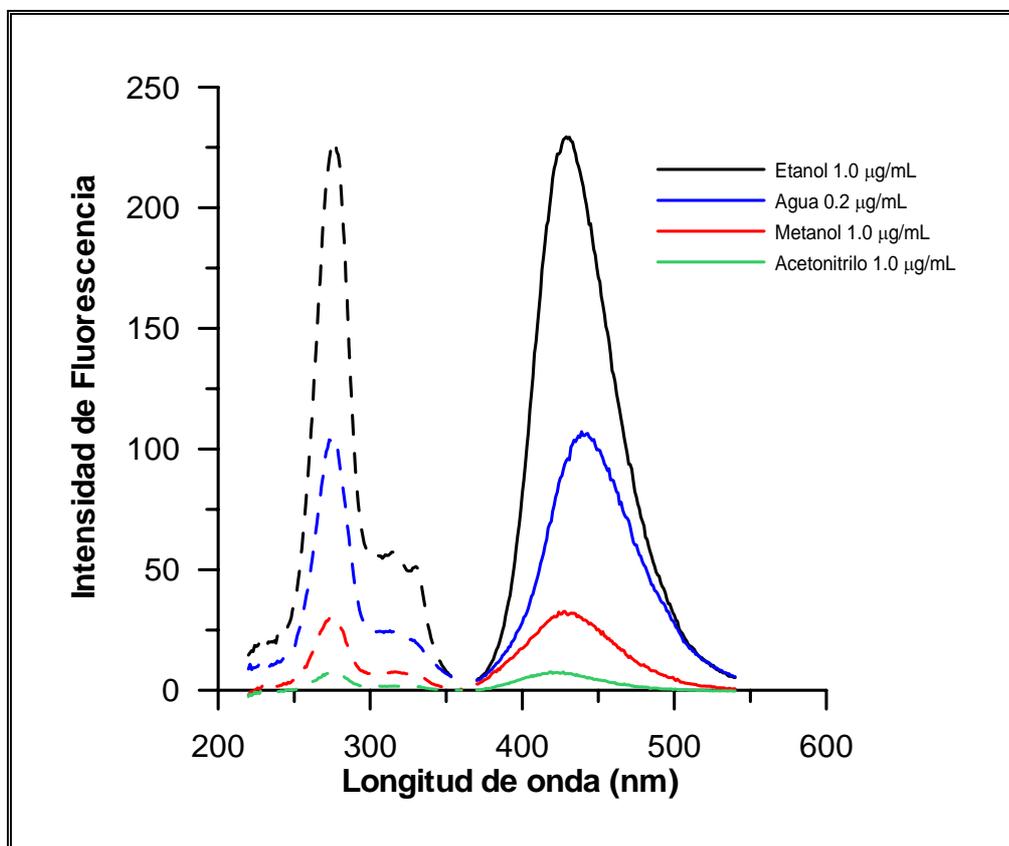


Figura II. 1.- Espectros de emisión (—) y excitación (---) del norfloxacino, en diferentes disolventes (V=710v)

Como se puede observar, es en agua donde la especie presenta mayor señal fluorescente. En metanol y etanol, tenemos una señal similar en cuanto a los máximos de excitación y emisión, siendo más fluorescente en etanol. La solubilidad del norfloxacino es mayor en etanol que en agua. La menor

sensibilidad corresponde al acetonitrilo, en el cual tenemos que incrementar la concentración diez veces más, que en los otros casos, para tener una señal considerable.

También se realizaron estudios con acetona, pero se comprobó que en este medio el norfloxacin no presenta fluorescencia.

Para cada disolvente, se realizó también un estudio de la estabilidad de las disoluciones diluidas, comprobándose que en etanol es donde presenta una estabilidad mayor, siendo ésta de alrededor de 5 horas.

Teniendo en cuenta que es en agua donde se observa mayor sensibilidad, pero dado que el norfloxacin es más soluble en etanol, decidimos utilizar etanol para preparar las disoluciones concentradas y a partir de ésta preparar las disoluciones de trabajo en agua.

Se estudió la estabilidad de las disoluciones madres en etanol, comprobándose que estas permanecían estables al menos durante 15 días.

Influencia de la acidez del medio

A partir de la disolución concentrada de etanol, se preparó una disolución diluida de norfloxacin en agua. Se fijó la fuerza iónica mediante la adición de una disolución de nitrato sódico, de forma que la concentración de ésta en la disolución final fuese de 0.1 M. El pH se fue modificando mediante la adición de pequeños volúmenes de disoluciones concentradas de hidróxido sódico o ácido clorhídrico. En el siguiente gráfico, Figura II. 2, podemos observar esta evolución, para una disolución de norfloxacin de 0.1 $\mu\text{g/mL}$, manteniendo el potencial del detector a 610 V.

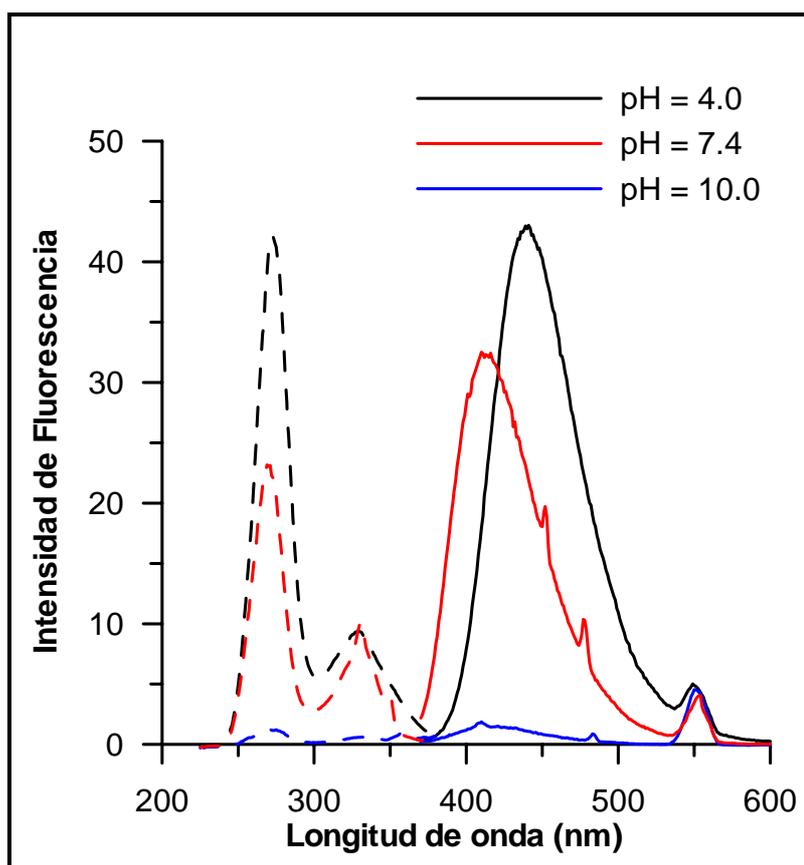


Figura II. 2.- Espectros de excitación y emisión de disoluciones acuosas de norfloxacino a diferentes valores de acidez.

Como podemos observar en la figura anterior, además de producirse una variación de la intensidad de fluorescencia al modificar la acidez del medio, también se produce un cambio en la forma de los espectros. Al acidular el medio, se produce un aumento de la señal fluorescente. Por el contrario al alcalinizar, se produce un notable descenso de la señal fluorescente. No sólo podemos observar una variación en la intensidad de las señales, sino que, además, tanto a pH neutros, como básicos, se produce un desplazamiento hipsocrómico con respecto al medio ácido.

En la Figura II. 3, se representa la variación de la intensidad fluorescente, medida a $\lambda_{em} = 437$ nm respecto al pH. Observamos dos mesetas, una entre valores de pH 2-5 y otra entre los valores de pH 6-8, siendo la primera, la de mayor intensidad.

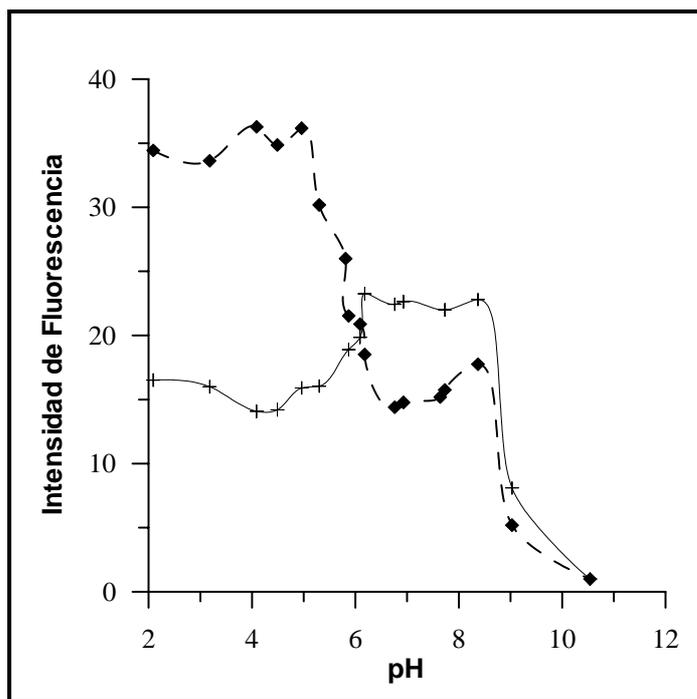


Figura II. 3.- Evolución de la fluorescencia con el pH a $\lambda_{em}= 437 \text{ nm}$ ($\lambda_{exc}= 272 \text{ nm}$) (----) y a $\lambda_{em}= 411 \text{ nm}$ ($\lambda_{exc}= 272 \text{ nm}$) (—)

Para fijar la acidez del medio, es conveniente emplear disoluciones reguladoras de pH, por lo que es necesario comprobar el efecto que ejercen estas disoluciones en la señal del analito, así como la influencia de la concentración de la misma. Para fijar el medio ácido, se emplea el tampón acético-acetato, mientras que para fijar el medio a pH neutro, se empleó el tampón Tris-hidroximetil aminometano /HCl.

En primer lugar se prepararon dos disoluciones de la misma concentración de norfloxacin, fijando el pH a 4 y 7 mediante la adición del correspondiente volumen de disolución de ácido clorhídrico o hidróxido sódico, respectivamente, y otra mediante la adición de un volumen de disolución tampón. Se observó que no se producían variaciones importantes ni en la morfología de los espectros, ni en las intensidades de los mismos. Seguidamente se comprobó la influencia de la concentración de la disolución tampón. En la Figura II. 4, observamos dichas influencias.

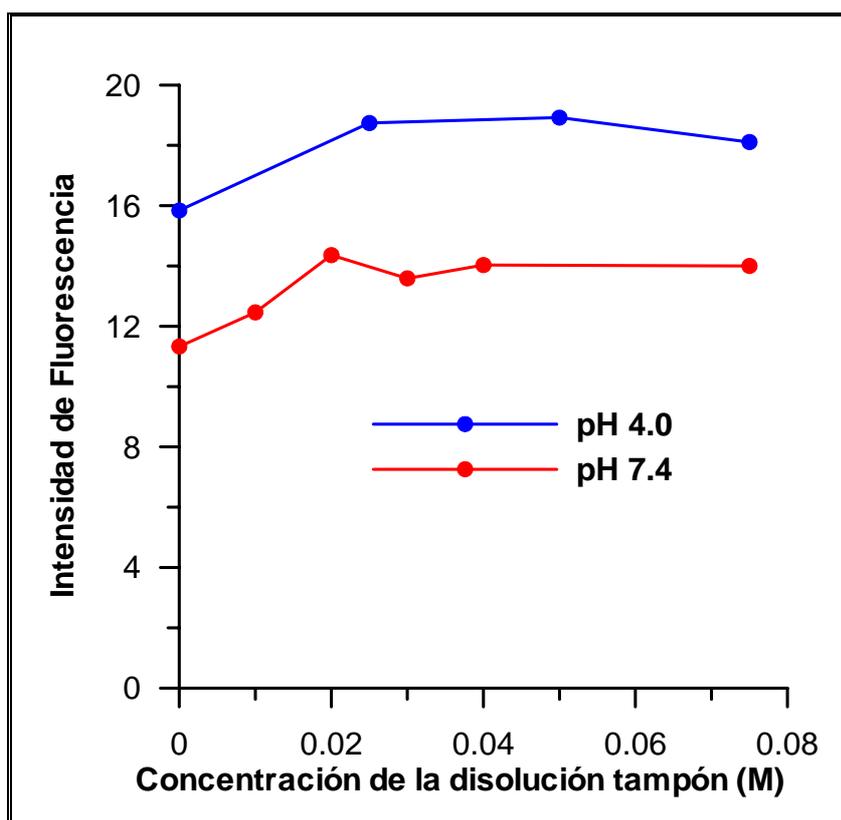


Figura II. 4.- Influencia de la concentración de disolución tampón, tris hidroximetil aminometano / HCl (pH =7.4) y ácido acético/ acetato sódico (pH = 4.0)

Se establece como concentración óptima de tampón la de 0.02 M, ya que es la menor concentración de disolución tampón a partir de la cual la intensidad de fluorescencia permanece constante.

Finalmente, para terminar los estudios relativos a la acidez del medio, se registraron los correspondientes espectros tridimensionales a los valores de pH de 7.4 y 4.0, como podemos ver en la Figura II. y

Figura II. .

La obtención de la matriz de fluorescencia total para el norfloxacin nos permite ver las propiedades fluorescentes de la molécula de forma global, y mediante las proyecciones bidimensionales de contornos, establecer claramente las características fluorescentes de la molécula en los diferentes medios de acidez, con objeto de compararla con las que presentan las demás fluoroquinolonas de interés.

Observamos que, a pH neutro aparecen dos máximos de excitación claramente definidos, uno a 320 nm y el otro a 270 nm, y un único máximo de emisión fluorescente a 410 nm. A pH 4.0, únicamente presenta un máximo de excitación, sobre 275 nm. El máximo de emisión para este medio está en 440 nm. Vemos que se ha producido por tanto un desplazamiento batacrómico del máximo de emisión al disminuir el pH.

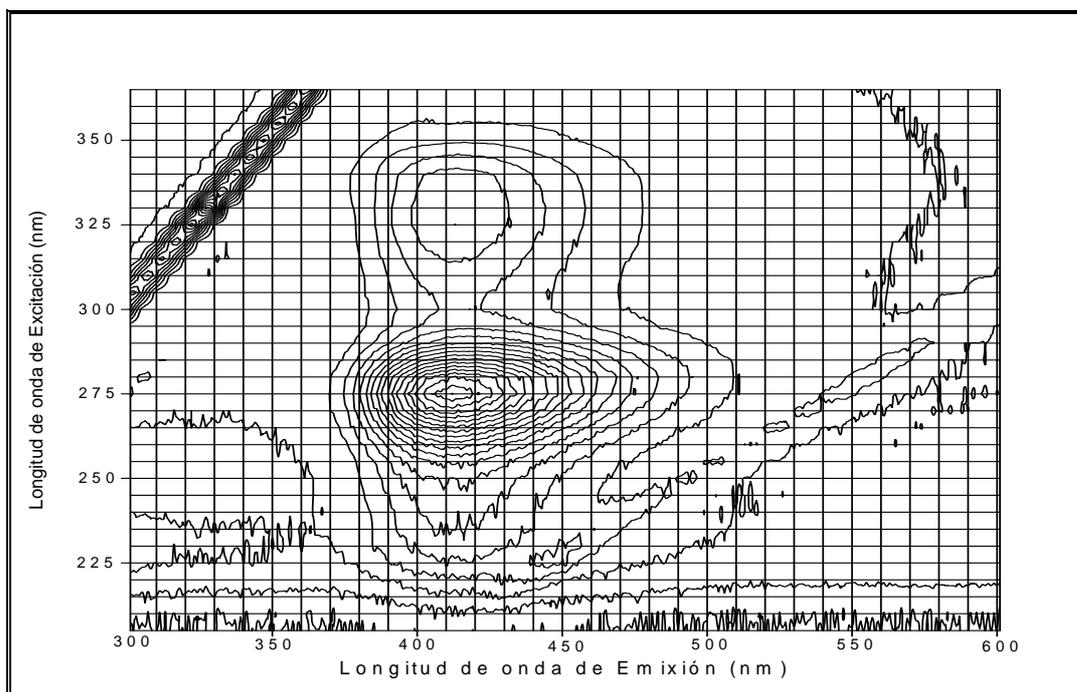


Figura II. 5.- Mapa de contorno de norfloxacino a pH 7.4, [NOR] = 0.1 µg/mL.

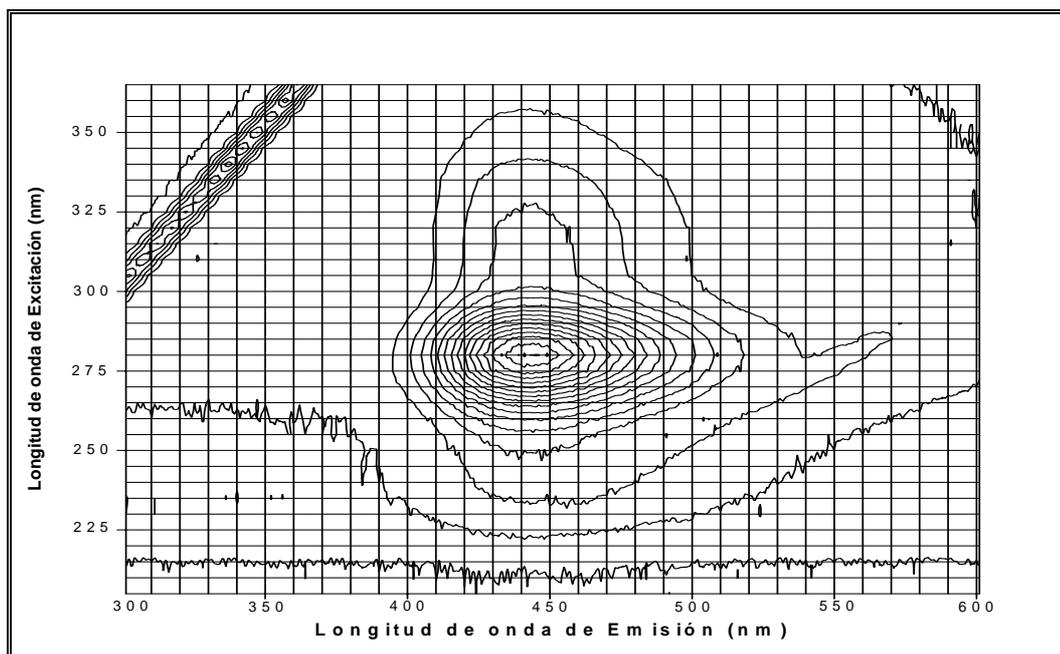


Figura II. 6.-Mapa de contorno de norfloxacino a pH 4.0, [NOR] = 0.1 µg/mL.

Determinación de valores de pK_A

A partir de los datos obtenidos en el estudio de la variación de la intensidad de fluorescencia con el pH, es posible calcular los valores de las constantes de disociación, pK_A. En la bibliografía existen diferentes métodos que nos permiten realizar estudio. Se ha seguido el método original propuesto por Stenström y Goldsmith¹ modificado por Bridges, Davies y Williams² para un sistema fluorescente. En él, la constante de equilibrio de la reacción ácido-base:



Se calcula según la ecuación:

$$K_a = \frac{F - F_{AH}}{F_B - F} [\text{H}^+] \quad \text{Ecuación 1}$$

¹ Stenström W., Goldsmith N. *Journal Physics Chemistry*, 30, 1638, 1926

² Brindes J.W., Davies S.D., Williams R.T. *Journal Biochemistry*, 98, 451, 1966

en la que F_{AH} es la fluorescencia correspondiente a la forma ácida sin disociar; F_B la fluorescencia de la base conjugada y F la fluorescencia a un determinado pH correspondiente a una mezcla en equilibrio de ambas especies. Tomando logaritmos en la expresión anterior, queda:

$$pK_a = pH - \log \frac{F - F_{AH}}{F_B - F} \quad \text{Ecuación 2}$$

Al aplicar esta ecuación a las señales de fluorescencia obtenidas, calculamos los valores de pK_A para cada señal y posteriormente calculamos el valor medio.

En la bibliografía³ están descritos los diferentes valores de pK correspondientes a los equilibrios que con el pH presenta el norfloxacin, coincidiendo dichos pK con los datos del experimento realizado. Así, en la bibliografía⁴ nos encontramos los valores de pK de 6.30 y 8.38. Recientemente⁵, han sido calculados estos valores de pK mediante técnicas potenciométricas, fijando unos valores de pK en agua de 6.22 y 8.22, y en acetonitrilo/agua al 50 % unos valores de pK de 7.98 y 9.05. También han sido constatados los valores de pK para este analito mediante electroforesis capilar en medio acuoso, proporcionando unos valores de pK de 5,94 y 9,05 empleando agua como disolvente.

Los resultados obtenidos en nuestros estudios, en las condiciones mostradas anteriormente, son los siguientes: 5.90 y 8.77 respectivamente.

³ Dracopoulos, A.I., Ioannou, P.C. *Anal Chimica Acta*, 354, 197, 1997.

⁴ Ross, D.L., Riley, C.M. *Journal Pharmaceutics*, 63, 237, 1990

⁵ Barbosa, J., Barrón D., Jiménez, E., Sanz V., *Analytica Chimica Acta*, 437, 309, 2001

Los equilibrios son los siguientes:

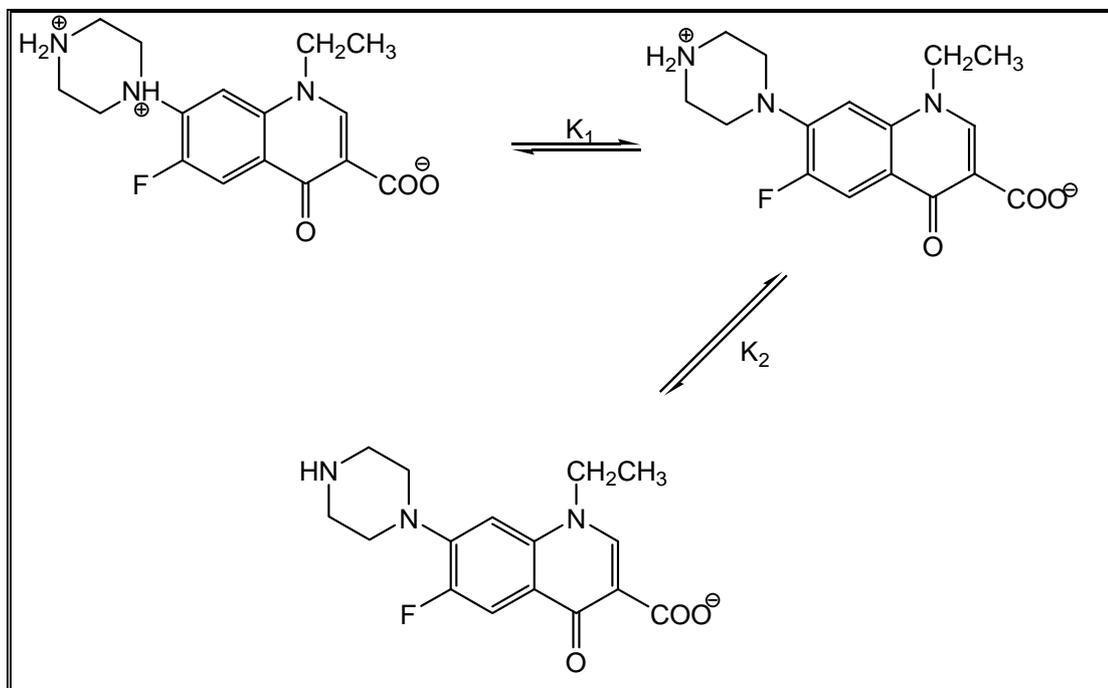


Figura II. 5.- Estructuras del norfloxacin en funci3n de la acidez del medio.

En medio 3cido, pH < 6 se protona el nitr3geno de la amina terciaria piperac3nica, dando lugar entre pH 6-8 a la forma zwitteri3nica, que pierde el prot3n a pH > 9

Efecto en la adición de un agente surfactante

Una vez que se ha establecido como mejor disolvente de trabajo el agua, y la influencia de la acidez del medio, se estudió el efecto que ejerce en la fluorescencia la presencia de un agente surfactante. Se utilizó *dodecilsulfato sódico* (SDS), que en medio acuoso presenta una concentración micelar crítica de 8.1 mM⁶.

En presencia de SDS, se observó un notable incremento de la señal de fluorescencia, así como un ligero desplazamiento de la longitud de onda de máxima emisión fluorescente a longitudes de ondas menores, situándose en 430 nm. También se observa un pequeño incremento en el ruido de la señal. En la Figura II. 6 podemos observar una comparación de los espectros en ausencia de surfactante y en presencia del mismo.

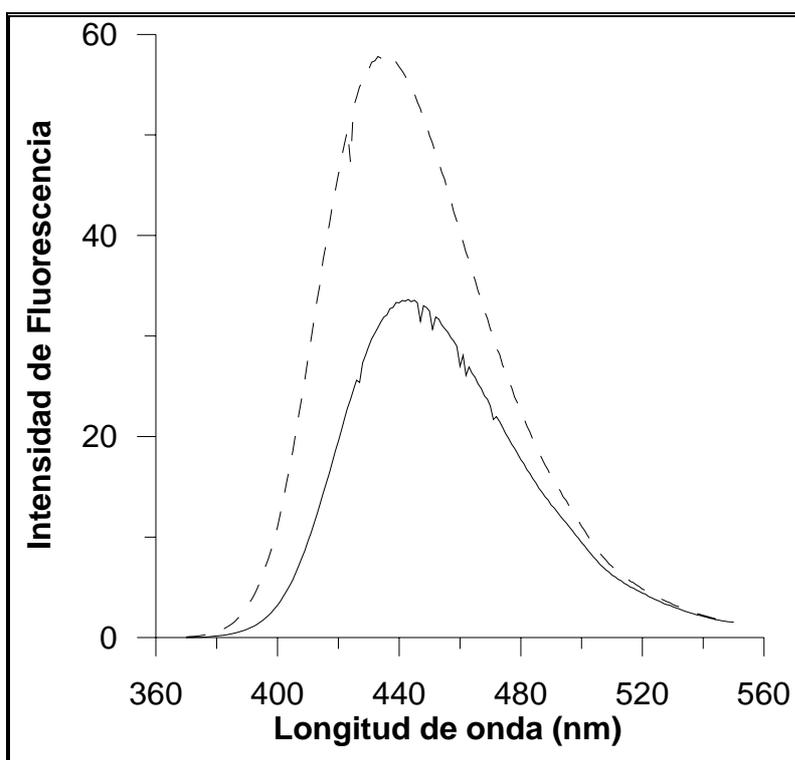


Figura II. 6.- Norfloxacin en presencia (---) y ausencia (—) de SDS. [NOR]=0.1 $\mu\text{g/mL}$, [SDS]=14.0 mM. (λ_{ex} 278 nm), V=530 V.

⁶ Handbook of chemistry and physics 60th edition. CRC press. USA. 1980

Cuando se determinó la influencia de la concentración de SDS sobre la intensidad de fluorescencia, como se observa en la Figura II. 7, se vió que a medida que se incrementa la concentración de tensoactivo, se produce un incremento de la señal, hasta llegar a un valor de concentración de SDS, superior a la concentración micelar crítica (CMC), y a partir del cual la fluorescencia permanece constante. El comportamiento es similar a los dos valores de pH estudiados.

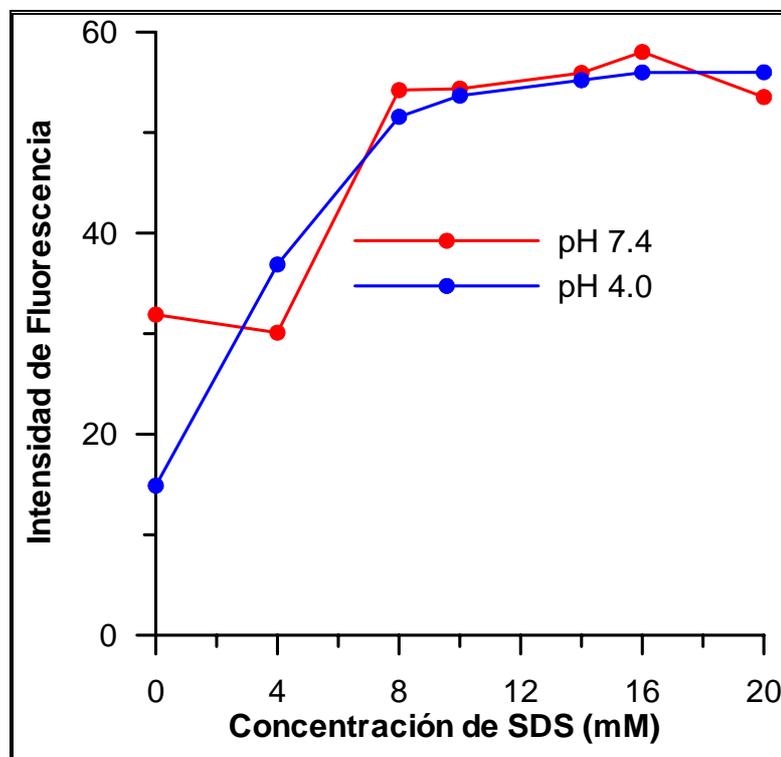


Figura II. 7.- Influencia de la concentración de SDS sobre la fluorescencia. [NOR]=0.1 $\mu\text{g/L}$, $V=530\text{v}$

A partir de una concentración próxima a la CMC, la intensidad de fluorescencia permanece constante, por lo que fijamos una concentración de 12.0 mM en SDS algo superior a la CMC.

Efecto de la adición de agentes oxidantes

El efecto que la presencia de diversos oxidantes ejercen sobre la fluorescencia del norfloxacinó fue estudiado en diferentes medios de acidez. Así, se ensayaron oxidantes fuertes, como el permanganato en medio ácido, y oxidantes débiles como I_2/I^- en medio básico y peróxido de hidrógeno en medio ácido.

El efecto producido por todos los oxidantes en el norfloxacinó fue similar, produciéndose un incremento de la señal de fluorescencia, no observándose desplazamientos dignos de destacar de los valores de λ característicos.

Efecto de la irradiación externa

Se estudió el efecto que produce en la fluorescencia la irradiación de la muestra con una fuente externa de radiación UV. Se observó inicialmente un incremento de la señal con respecto a una muestra no irradiada, siendo este efecto mayor en etanol. Este hecho nos condujo a la realización de un seguimiento de la señal fluorescente a diferentes tiempos de irradiación. Observamos que, a medida que aumenta el tiempo de irradiación, la señal aumentaba en mayor medida, sin llegar a ninguna meseta. Los tiempos que se ensayaron alcanzaron los 20 minutos de irradiación. Aunque parece ocurrir reacción inducida, posiblemente se formen varios compuestos de forma sucesiva. Este efecto será objeto de posteriores estudios en profundidad en esta memoria.

2. Estudio de las propiedades analíticas del Enoxacino

Estudios fluorimétricos

Comportamiento frente a diferentes disolventes

Para determinar las propiedades espectrales del analito, se registraron los espectros de emisión y excitación en diferentes disolventes. Se ensayaron los mismos disolventes que se utilizaron para el norfloxacin.

En la Figura II. 8 se muestran los diferentes espectros de excitación y emisión utilizando los diferentes disolventes.

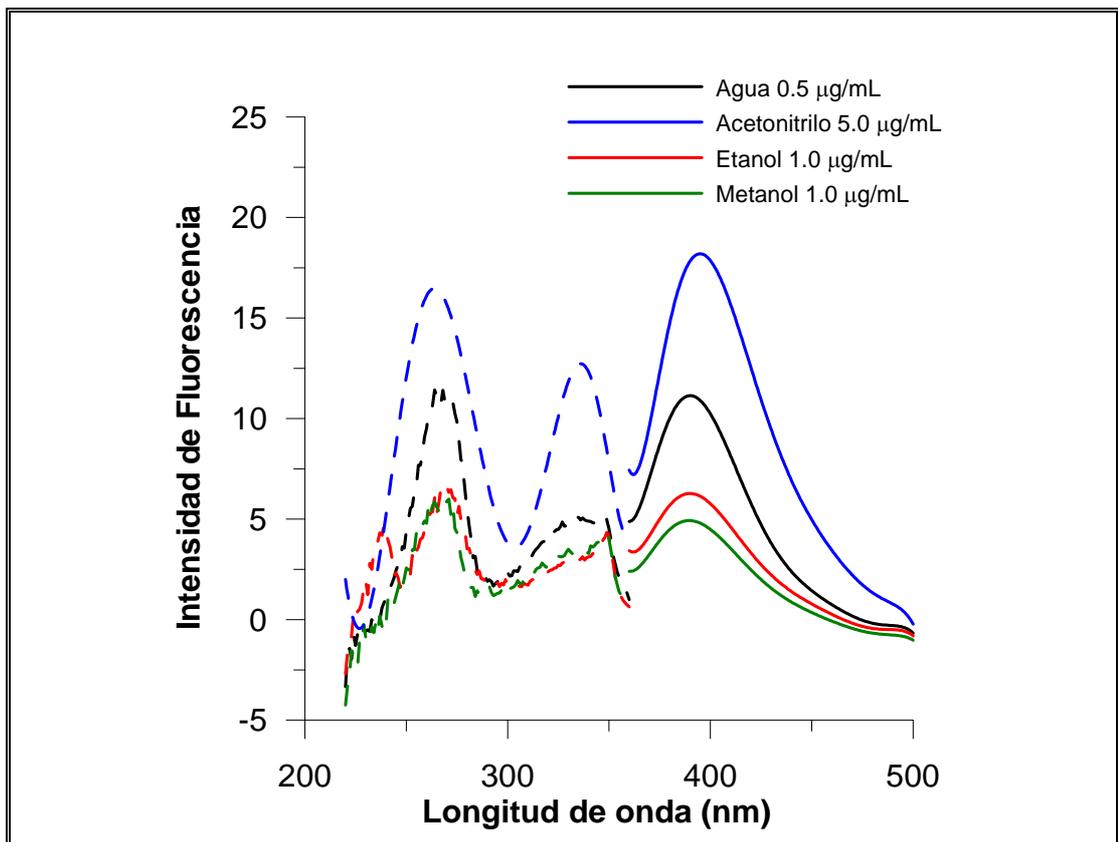


Figura II. 8.- Espectros de emisión y excitación del enoxacino en diferentes disolventes. (V=710 V)

Al igual que para el norfloxacin, el enoxacin presenta su mayor fluorescencia en medio acuoso. En metanol la señal fluorescente, es más intensa que en etanol. Finalmente, el disolvente en el cual el principio activo presenta menor sensibilidad es el acetonitrilo.

Nuevamente, se utilizó acetona para ver las propiedades fluorescentes del enoxacin, pero con este disolvente, al igual que para el norfloxacin, no se observa fluorescencia.

Aunque sea en agua donde el analito presenta mayor señal fluorescente, el problema radica en la etapa de disolución, ya que utilizando agua este proceso nos lleva un tiempo mayor que utilizando cualquiera de los otros. Además, en agua, el enoxacin presenta una baja estabilidad. Nuevamente decidimos disolver el enoxacin en etanol con objeto de preparar las disoluciones concentradas, y preparar las disoluciones diluidas en agua.

El estudio de la estabilidad de las disoluciones concentradas del analito en etanol, nos indicó que esta es estable al menos durante 15 días. Las disoluciones diluidas en agua, presentan una estabilidad de 5 horas.

Influencia de la acidez del medio

A partir de la disolución concentrada de etanol, se preparó la correspondiente disolución diluida de enoxacin en agua. Fijamos la fuerza iónica mediante la adición de nitrato sódico, de forma que la concentración final de la sal fuese de 0.1 M. El pH se fija mediante la adición de pequeños volúmenes de hidróxido sódico o ácido clorhídrico, de diferentes concentraciones.

Figura II. 9 observamos la forma de los diferentes espectros de enoxacin a tres valores de pH; neutro, ácido y básico, donde existe un comportamiento diferente. El potencial del detector se fijó en 710 V. La concentración del enoxacin se fijó en 1.0 µg/mL.

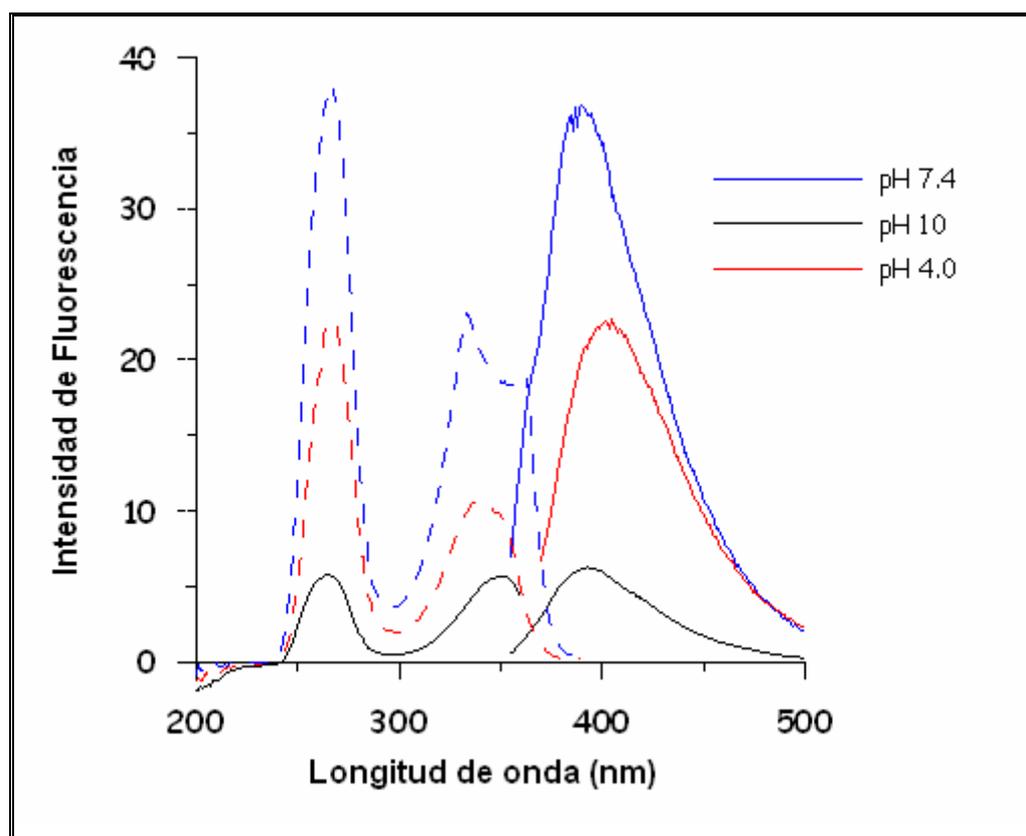


Figura II. 9.- Espectros de excitación y emisión para enoxacino a diferentes valores de pH. [ENO]=1.0 µg/mL

Observamos como el máximo de excitación que aparece sobre los 270 nm permanece prácticamente constante para los tres valores de pH. En cuanto a los espectros de emisión se observa que, a valores de pH básicos y ácidos se produce una disminución de la intensidad de fluorescencia con respecto a la observada en medio neutro, siendo pH = 7.4 el valor donde se produce una mayor señal fluorescente.

Figura II. 10, se representa la evolución de la intensidad de fluorescencia, para los diferentes valores de pH ensayados. Las condiciones experimentales son idénticas a las indicadas anteriormente.

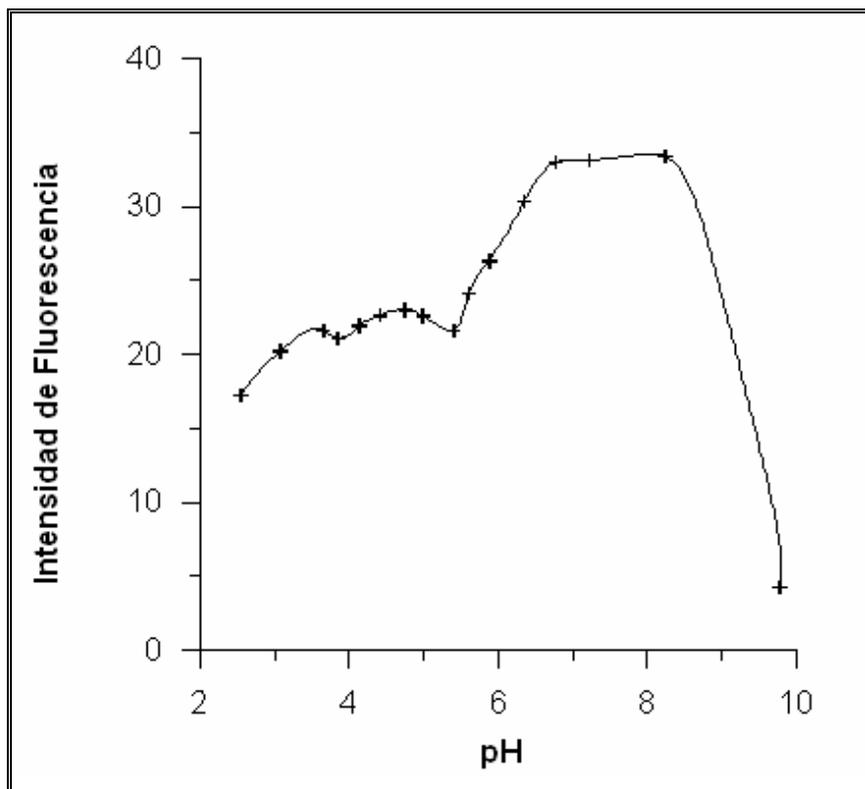


Figura II. 10.- Evolución de la fluorescencia con el pH. [ENO]= 1.0 $\mu\text{g/mL}$ V=710 v (λ_{exc} 267 nm, λ_{em} 402 nm).

Para el enoxacino se observan dos mesetas, la primera comprendida entre los valores de pH 4-5, y una segunda meseta entre los valores de 7-8.5, de mayor intensidad. Observamos que a valores de acidez próximos a la neutralidad, es donde el analito presenta mayor fluorescencia.

Del mismo modo que para el analito anterior, se ha calculado una de las constantes de acidez de este analito². El valor que se obtiene para el primer pK es de 6.04 y para el segundo pK un valor de 9.45. En la bibliografía⁵ están tabulados los valores de pK para este analito por diferentes técnicas. Empleando técnicas potenciométricas se obtienen unos valores de 6.00 y 8.50.

Se procedió a estudiar la influencia de la presencia del tampón y su concentración en la señal fluorescente. Para ello, se preparó una disolución acuosa de enoxacino, y se registraron los espectros de emisión para diferentes concentraciones de tampón.

Los resultados que se obtuvieron se recogen en la Figura II. 11.

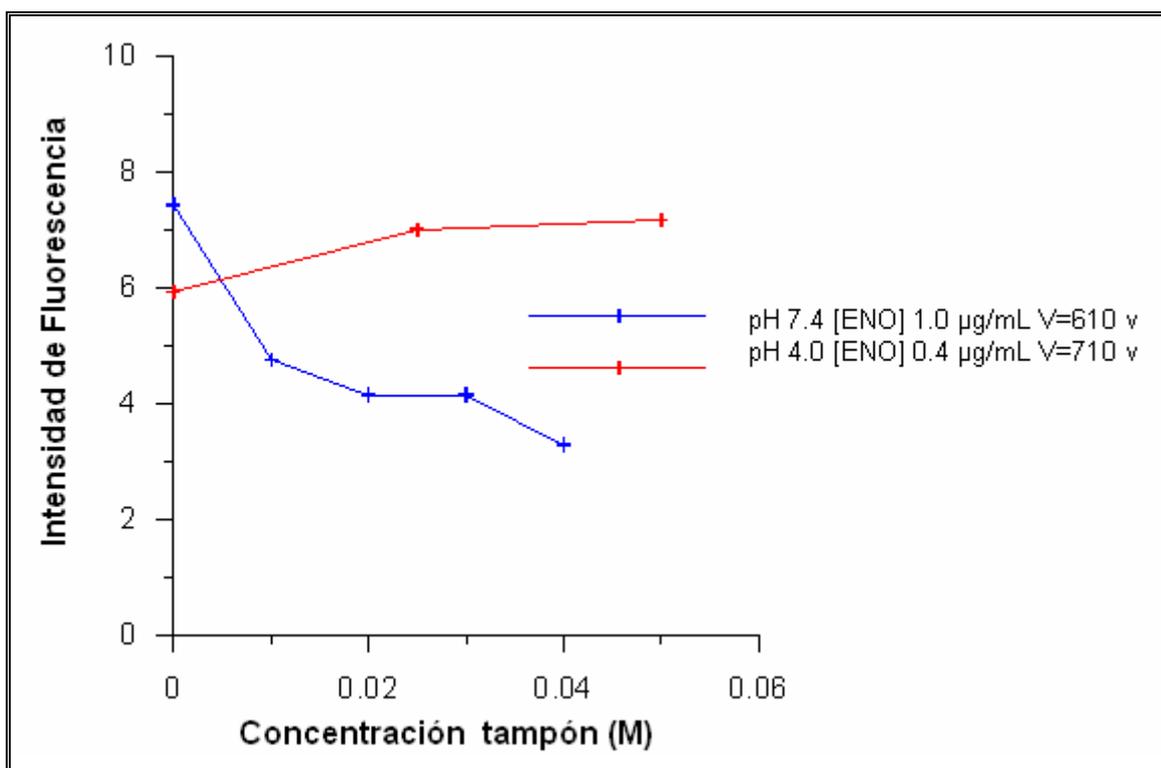


Figura II. 11.- Comportamiento de la fluorescencia del enoxacino al modificar la concentración del tampón, a pH 7.4 y 4.0

Para fijar el pH a valor de 4.0, se utiliza el tampón acético acetato, y para fijar la acidez al valor de 7.4 el tampón tris-hidroximetil aminometano/HCl. Se fijó como concentración óptima de trabajo la de 0.02 M.

Se observa como a pH neutros a medida que se incrementa la concentración de tampón se produce una disminución de la señal fluorescente.

Finalmente, se registraron los espectros tridimensionales para el enoxacino a los valores de acidez de 7.4 y 4.0. En la Figura II. 12 y Figura II. 13 están representados los mapas de contorno para estos espectros tridimensionales. Con estos mapas de contorno podremos determinar de forma adecuada los correspondientes máximos de emisión y excitación, para el enoxacino a los dos valores de pH.

Para el caso de pH 7.4 tenemos dos máximos de excitación, uno a 270 nm, que es el que presenta mayor intensidad de señal fluorescente, y otro a 345 nm de menor intensidad. En cuanto a la emisión, sólo aparece un máximo a 395 nm.

Para el valor de pH 4.0, también observamos dos máximos de excitación, uno a 275 nm y uno a 335 nm. El primero de estos dos máximos es el que presenta mayor intensidad de señal fluorescente. El máximo de emisión aparece a 405 nm. Se ha producido un desplazamiento batocrómico con respecto al valor de acidez anterior.

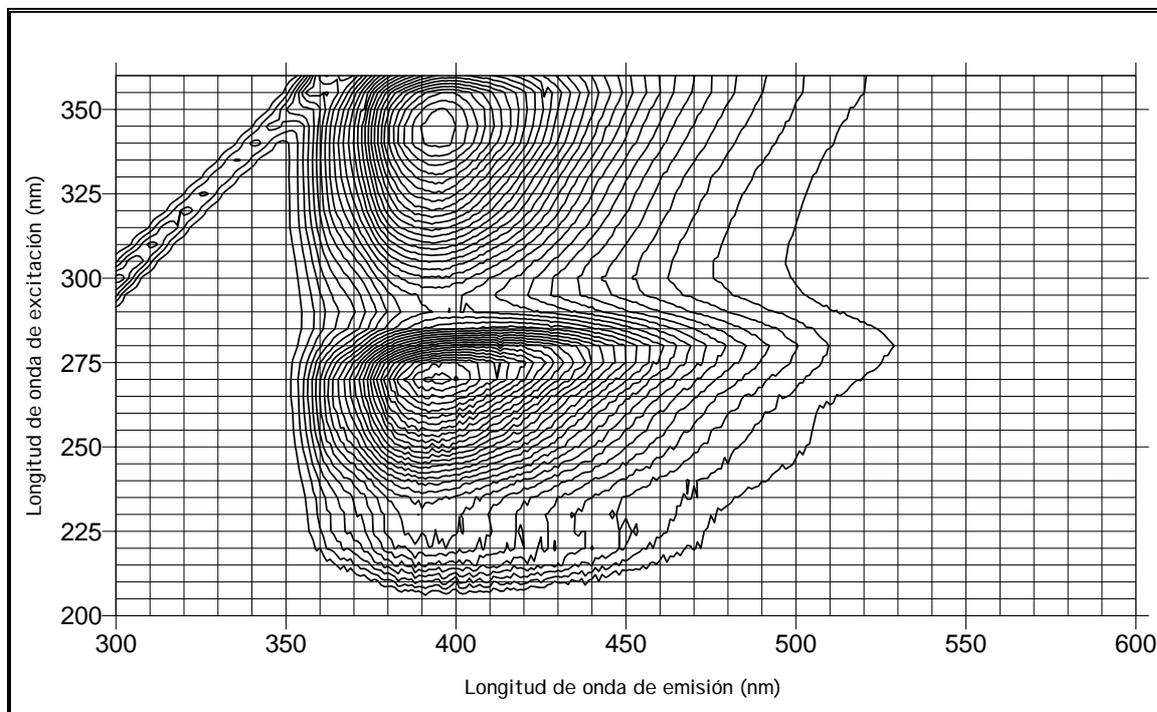


Figura II. 12.- Mapa de contorno para el enoxacino a una concentración de 1 $\mu\text{g/mL}$ y pH 7.4.

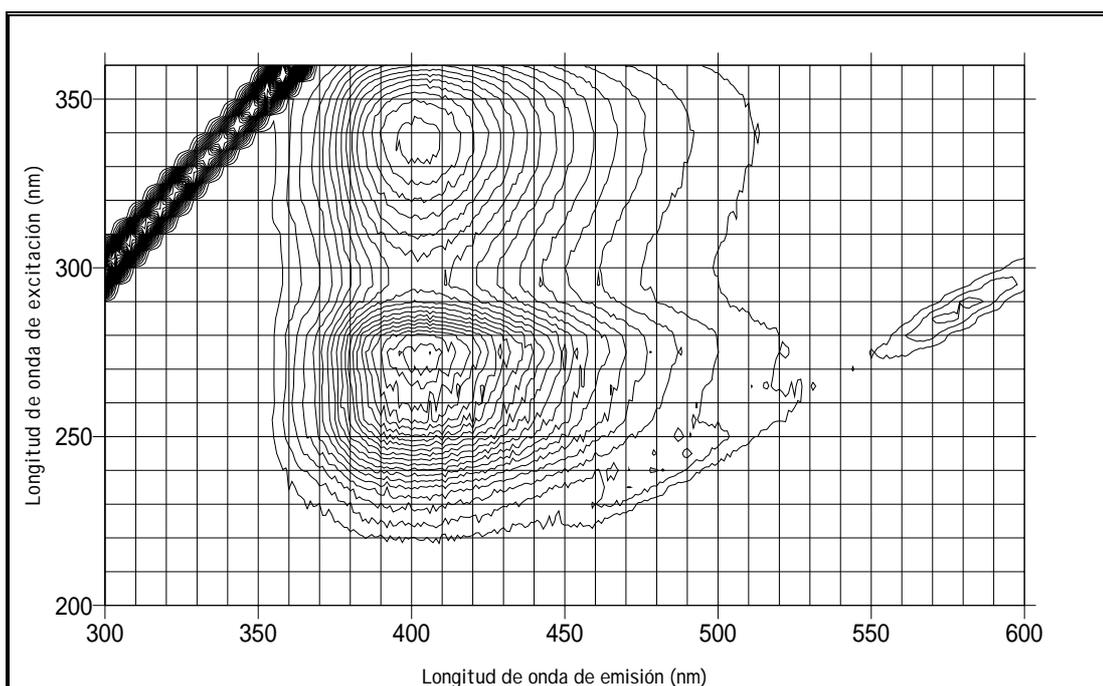


Figura II. 13.-Mapa de contorno para el enoxacino de concentración 1 µg/mL, pH 4.0

Efecto de la adición de un agente surfactante

Una vez establecido el disolvente de trabajo y la influencia de la acidez del medio, se estudió el efecto que ejerce en las propiedades fluorescentes la presencia de un agente tensoactivo. Nuevamente se ensayó con *dodecil sulfato sódico*. El resultado que se observa es que en presencia del agente surfactante, la fluorescencia del enoxacino se ve incrementada de forma importante; lo cual resulta especialmente interesante, ya que este derivado es el que presenta menor sensibilidad. En cuanto a la forma del espectro, se observa un ligero desplazamiento hipsocrómico del máximo de emisión, así como un incremento del ruido de la señal.

En la Figura II. 14, están representados los espectros de emisión fluorescente para el enoxacino, a pH 4.0 y en concentración 1.0 µg/mL, en presencia y ausencia de SDS.

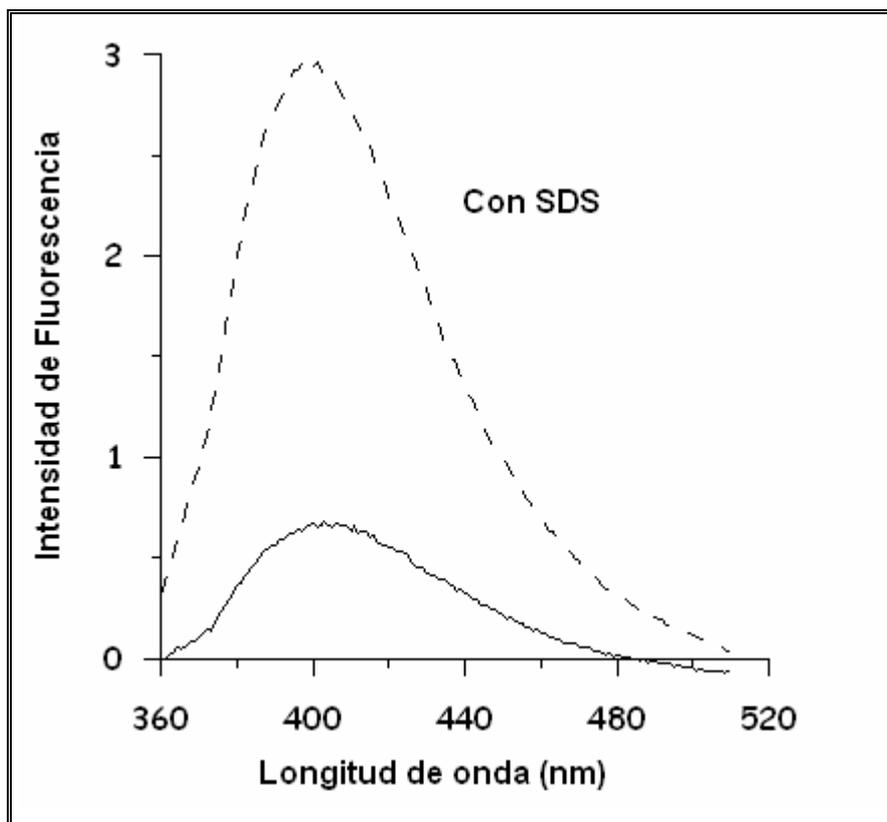


Figura II. 14.- Enoxacino en presencia (---) y ausencia (—) de SDS. [ENO]= 1 $\mu\text{g/mL}$, [SDS]=20.0 mM. (λ_{ex} 270 nm, $V=530$ V)

Una vez determinado el efecto positivo que ejerce el agente tensoactivo, se pasó a estudiar la influencia de la concentración de SDS. Para ello, a partir de una disolución concentrada de enoxacino en etanol, se preparó la correspondiente diluida en agua de concentración 1.0 $\mu\text{g/mL}$. A partir de 8.0 mM de SDS, la fluorescencia permanece constante. Se fija la concentración óptima de SDS en 12 mM al igual que para el norfloxacino, ya que como se observa en la Figura II. 15 esta concentración se encuentra dentro de la meseta de fluorescencia.

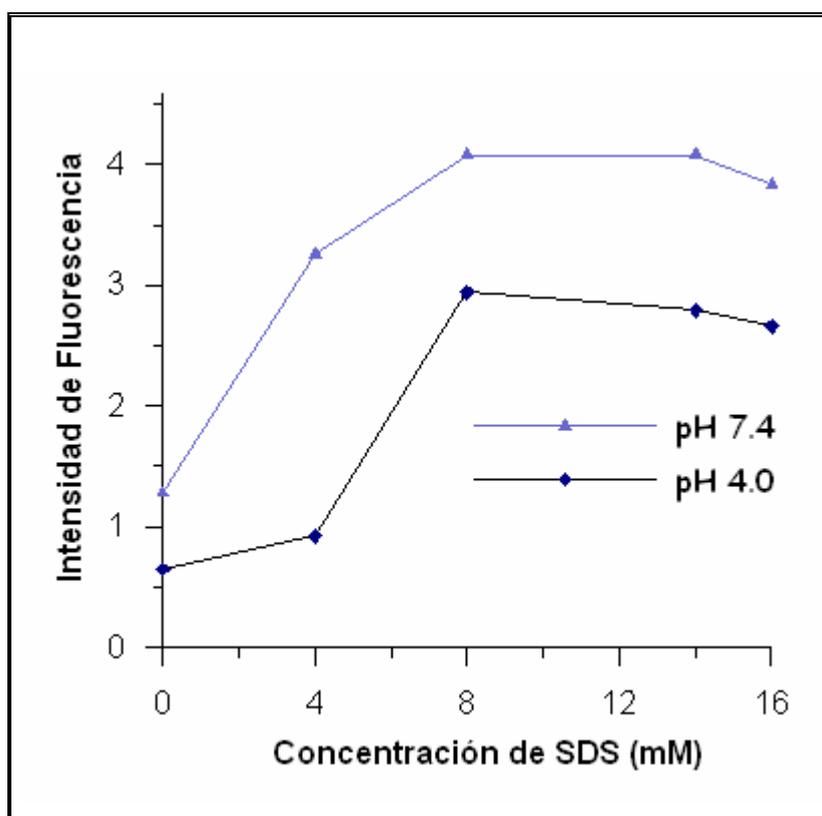


Figura II. 15.- Influencia de la concentración de SDS en la fluorescencia. [ENO]=1.0 $\mu\text{g/mL}$. V= 530V

Efecto de la adición de agentes oxidantes.

Se ensayó el efecto que diferentes agentes oxidantes causan en la señal fluorescente del enoxacino. Para ello se prepararon disoluciones de oxidantes como el permanganato en medio ácido, y débiles como el I_2/I^- en medio básico y peróxido de hidrógeno en medio ácido.

En primer lugar se ensayó una mezcla de yodo/yoduro potásico, en medio básico. Al añadir a la disolución de enoxacino, la mezcla oxidante, se pierde instantáneamente la coloración típica del yodo, lo que nos indica que se debe producir algún tipo de reacción, simultáneamente se observa un paulatino aumento de la fluorescencia con el tiempo.

En la Figura II. 16 podemos ver como se produce este incremento de señal, para una disolución de enoxacino de concentración 2.0 $\mu\text{g/mL}$, fijando el potencial del detector en 650V.

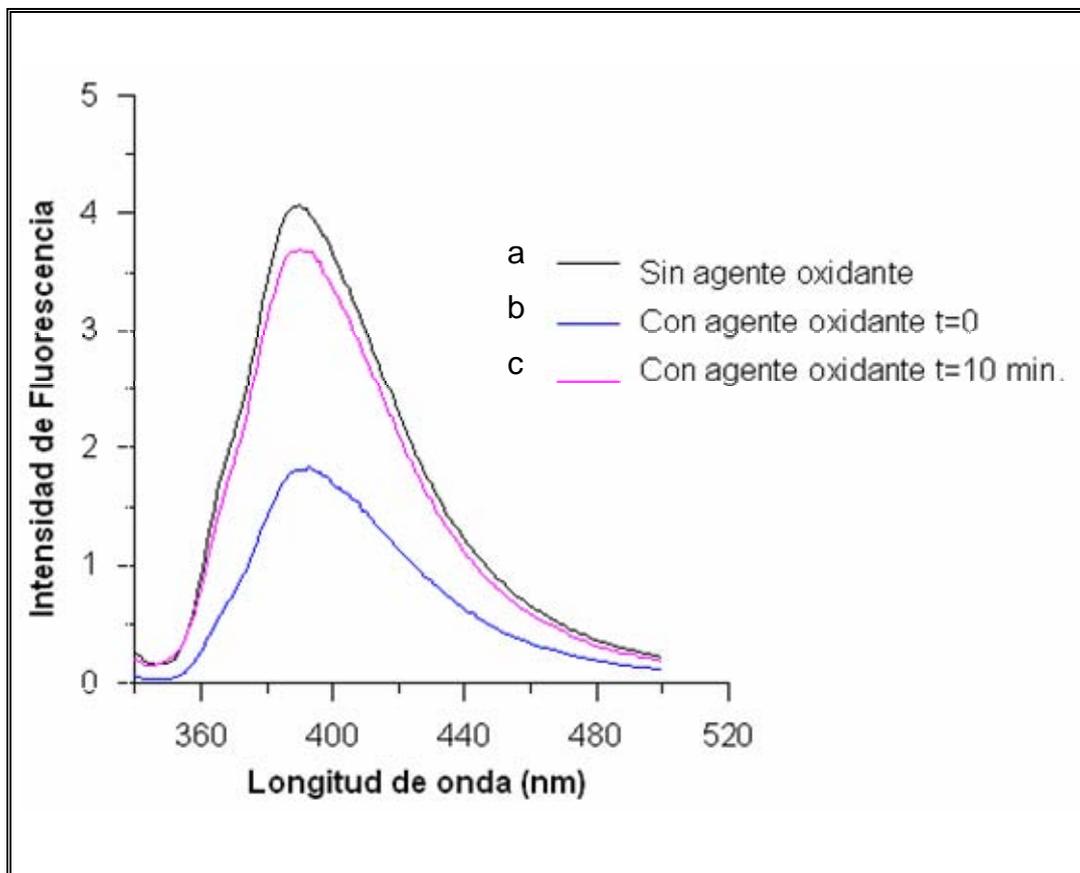


Figura II. 16.- Espectro de emisión del enoxacino (a) en medio básico, (b) en presencia de medio oxidante a tiempo 0 y (c) en presencia de agente oxidante a t=10 min

En segundo lugar, se ensayó con permanganato potásico, fijando la acidez del medio en un valor de pH de 5,5. Se observa un ligero incremento de la señal fluorescente, en presencia de permanganato cuando aumenta el tiempo de reacción. Esta evolución parece ser más rápida cuando aumenta la concentración de enoxacino.

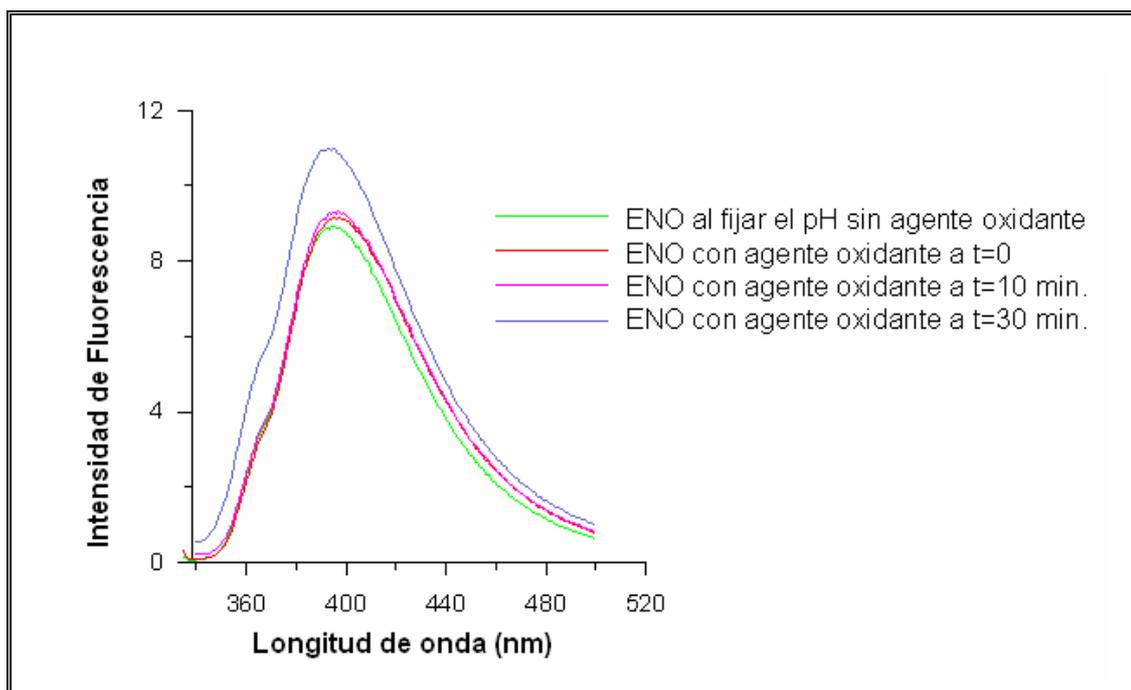


Figura II. 17.- Espectro de emisión de enoxacino, en disolución acuosa a pH 5, en presencia de permanganato a t=0, t=10 y t=30 minutos

Finalmente, se estudió el efecto que ejerce la adición de peróxido de hidrógeno, observándose un efecto similar al descrito con los otros oxidantes.

En conclusión, podemos decir que con todos los agentes oxidantes estudiados parece ocurrir alguna reacción de formación de derivados fluorescentes que aunque no parecen presentar características espectrales muy diferentes al original, si afectan al rendimiento cuántico de fluorescencia. En estudios futuros se evaluará la posibilidad de la utilización de dichas reacciones con fines analíticos desde el punto de vista cinético fluorimétrico.

Efecto de la irradiación externa.

Al hacer incidir sobre la muestra una radiación externa procedente de una lámpara UV, se observa un incremento importante de la señal fluorescente. Dado que se produce un incremento de la sensibilidad, se pasó a estudiar la influencia del tiempo de irradiación, para de este modo fijar el tiempo de irradiación adecuado, tanto en presencia como en ausencia de SDS. Los resultados obtenidos muestran que no se logra alcanzar una meseta en tiempos cortos.

Para hacer esta experiencia se prepararon dos disoluciones de 400 ng/mL de enoxacino, una en presencia de SDS en concentración 12.0 mM y otra en ausencia de SDS. Fueron irradiadas cada una durante 20 minutos en intervalos de 5 minutos, registrándose los correspondientes espectros de emisión fluorescente, observándose un aumento de la fluorescencia. Como en el derivado anteriormente estudiado, este efecto se valorará posteriormente en profundidad.

3. Estudios de las propiedades analíticas del ofloxacin.

Estudios fluorimétricos

Comportamiento frente a diferentes disolventes

Con objeto de determinar las características fluorescentes del ofloxacin, se registraron los espectros de excitación y emisión, utilizando para ello diferentes disolventes. Los disolventes que se han ensayado han sido agua, etanol, metanol, acetona y acetonitrilo.

En la Figura II. 18 observamos los espectros correspondientes a este principio activo.

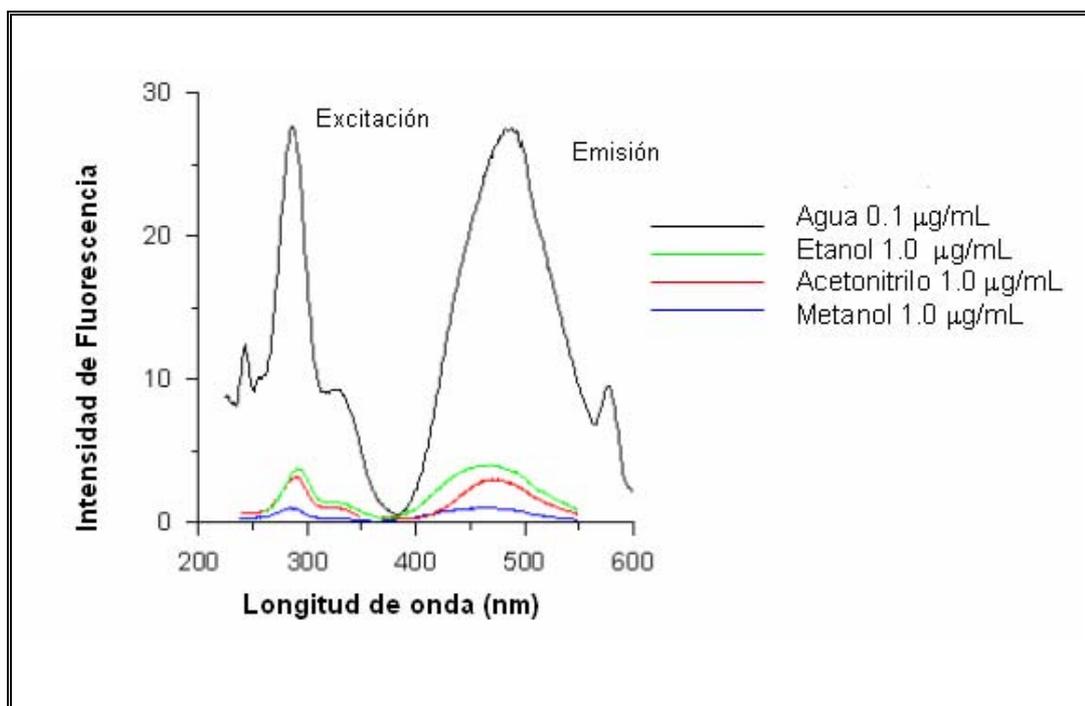


Figura II. 18.- Espectros de emisión y excitación del ofloxacin, en diferentes disolventes (V= 710 V).

Observamos que nuevamente es en agua donde el analito presenta una mayor señal fluorescente. Pero al igual que en los casos anteriores, es en este disolvente donde presenta mayor inestabilidad e insolubilidad. También, al igual que en los casos anteriores, con acetonitrilo se produce una disminución de la intensidad de fluorescencia y con acetona se pierde totalmente. Con respecto al etanol y metanol, vemos que la especie es más fluorescente en metanol, pero es en etanol donde presenta mayor estabilidad.

Concluimos que las condiciones adecuadas de trabajo son disolver el analito en etanol, y preparar las disoluciones diluidas en agua.

Finalmente, se estudio la estabilidad de las disoluciones concentradas en etanol, comprobándose que éstas permanecen estables al menos durante 15 días.

Al igual que en los principios activos anteriores, se realizó el estudio para determinar la estabilidad de las disoluciones diluidas de trabajo, comprobándose que son estables al menos durante 5 horas.

Influencia de la acidez del medio

A partir de la disolución concentrada de etanol, y al igual que en los casos anteriores, se prepara la correspondiente disolución diluida en agua. Se fija la fuerza iónica mediante la adición de un volumen de disolución de nitrato sódico, de forma que la concentración final fuese de 0.1 M. El pH se fue modificando mediante la adición de hidróxido sódico o ácido clorhídrico. En la Figura II. 19 observamos la morfología de los espectros de emisión y excitación, para tres valores de pH; ácido, neutro y básico.

Observamos que se produce un desplazamiento hipsocrómico a valores de acidez neutro y básico, con respecto al medio ácido. También se observa que es a valores de pH neutro donde la señal fluorescente es más intensa.

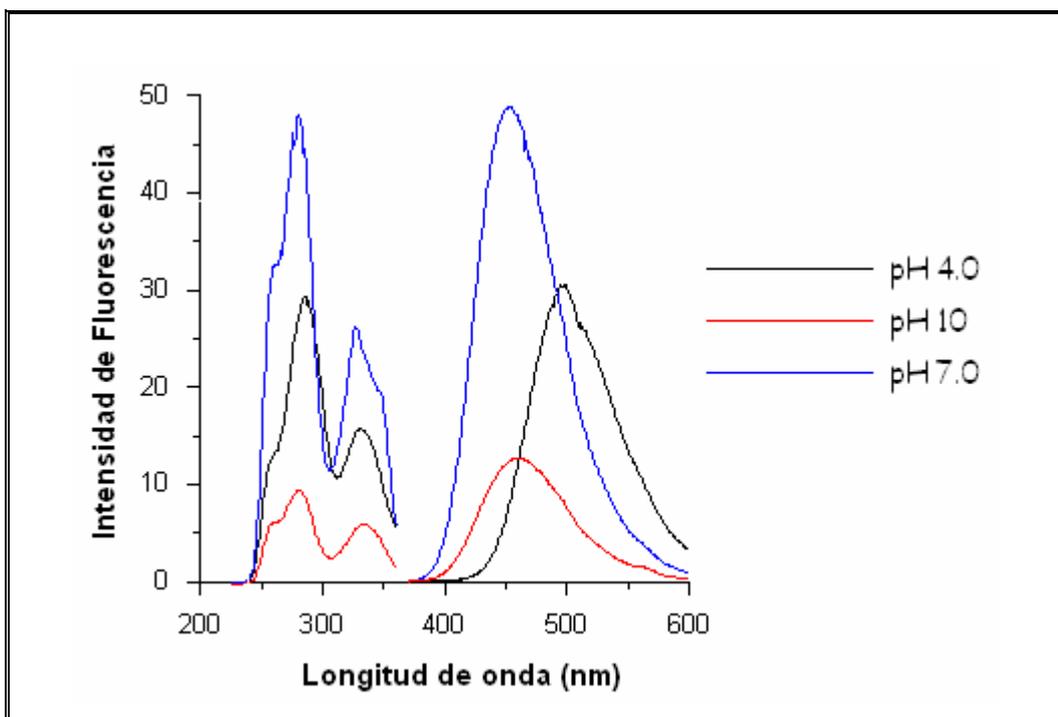


Figura II. 19.- Espectros de excitación y emisión de ofloxacino a diferentes valores de pH. [OFLO]= 1.0 μ g/mL. V=630v.

En la Figura II. 20, se muestra la variación de la intensidad de fluorescencia a valores diferente de acidez, para una disolución de ofloxacino. El estudio se realizó para disoluciones de ofloxacino de concentración 1.0 μ g/mL, y la acidez fue fijada mediante la adición de volúmenes de disoluciones de hidróxido sódico y ácido clorhídrico, en función del medio que se quería fijar. Se observa que la intensidad de fluorescencia permanece prácticamente constante entre los valores de pH comprendidos entre 3-8.

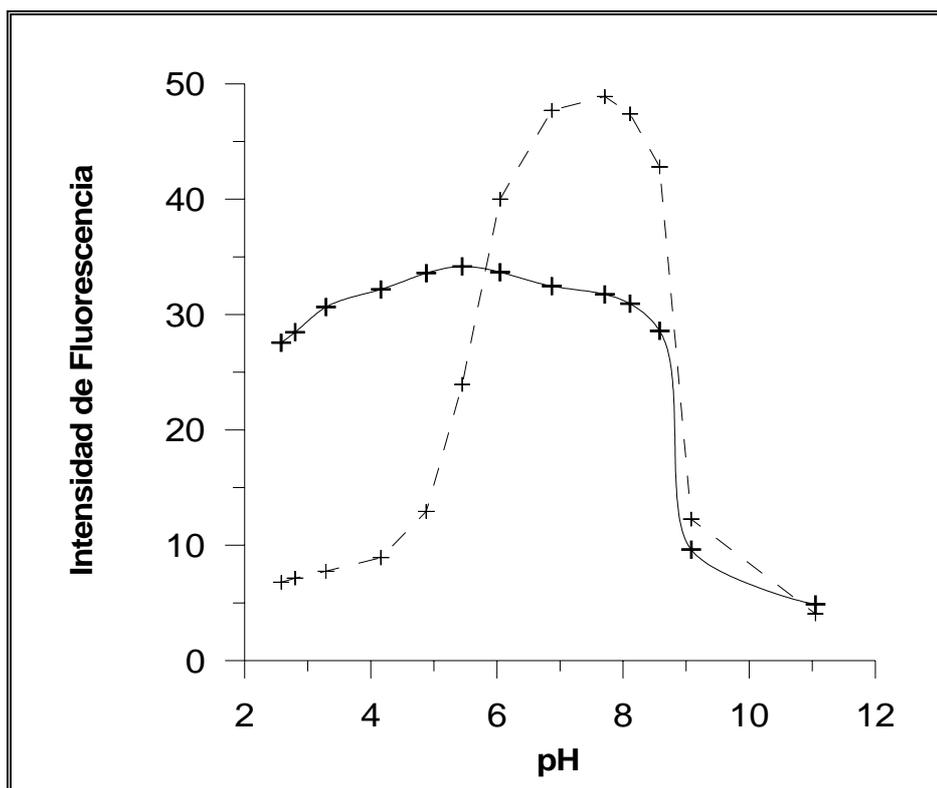


Figura II. 20.- Influencia de la acidez del medio. [OFLO] = 1.0 µg/mL. V=630v. λ_{em} 488 nm (---) y λ_{em} 451 nm (- - -) ; λ_{ex} 281 nm .

En la bibliografía⁴ encontramos unos valores de pK para el ofloxacino de 6.05 y 7.90. Empleando un disolvente acuoso con un 5,5 % de acetonitrilo por método fotométrico⁵ los valores de pK obtenidos son de 6,29 y 8.13.

Con los datos obtenidos, se han calculado² los valores de pK, obteniéndose los siguientes valores de 5.59 y 8.95.

La acidez del medio, para los siguientes estudios, será fijada mediante la adición del tampón adecuado, por lo que es necesario estudiar el efecto que ejerce sobre las propiedades fluorescentes la adición de una disolución reguladora de pH, así como el efecto de su concentración. Al igual que en los fármacos anteriores, se estudiará el tampón acético acetato y el tris-hidroximetilaminometano/ HCl, para fijar pH 4.0 y 7.4 respectivamente.

En la siguiente gráfica, Figura II. 21, se muestran los resultados obtenidos para una disolución de enoxacino de 1.0 µg/mL.

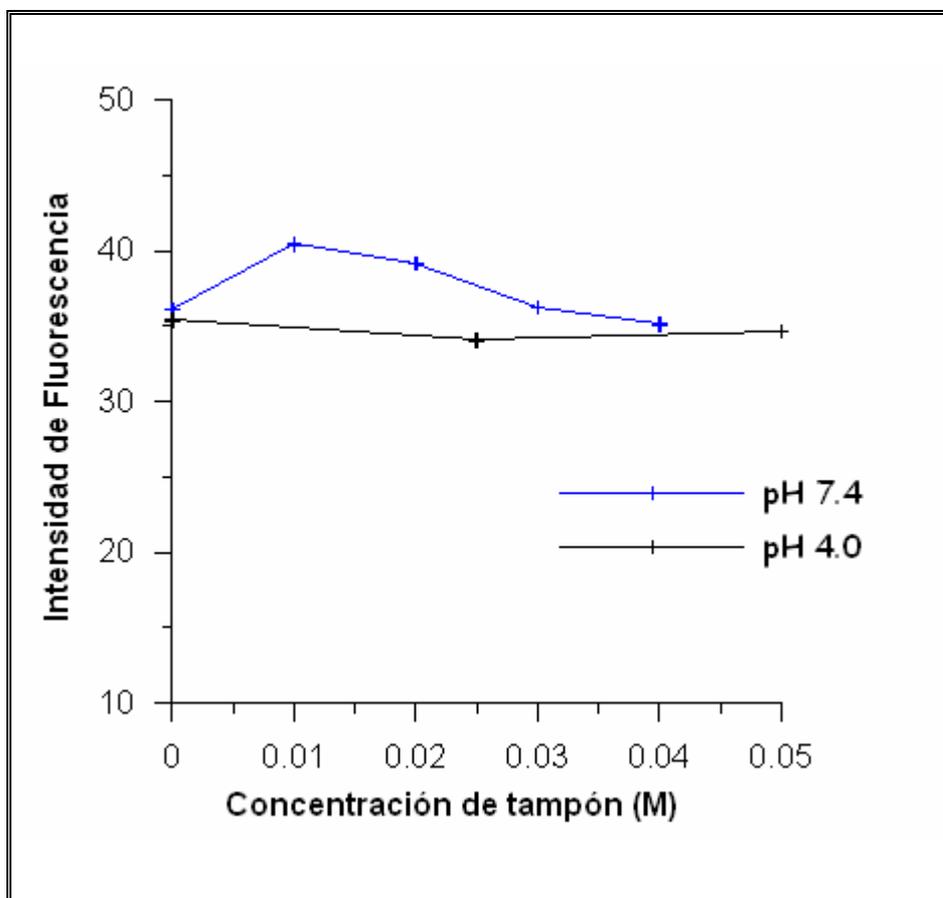


Figura II. 21.- Influencia de la concentración de tampón. [OFLO]= 1.0 µg/mL V = 610v, λ_{exc} = 289 y 281 nm (pH 4.0 y 7.4 respectivamente).

En vista al gráfico anterior, elegimos como óptima la concentración de tampón de 0.02 M.

Finalmente, se registraron los correspondientes espectros de tridimensionales para el ofloxacino, a los dos valores de pH. En las Figura II. 22 y Figura II. 23, están representados los mapas de contorno para este analito.

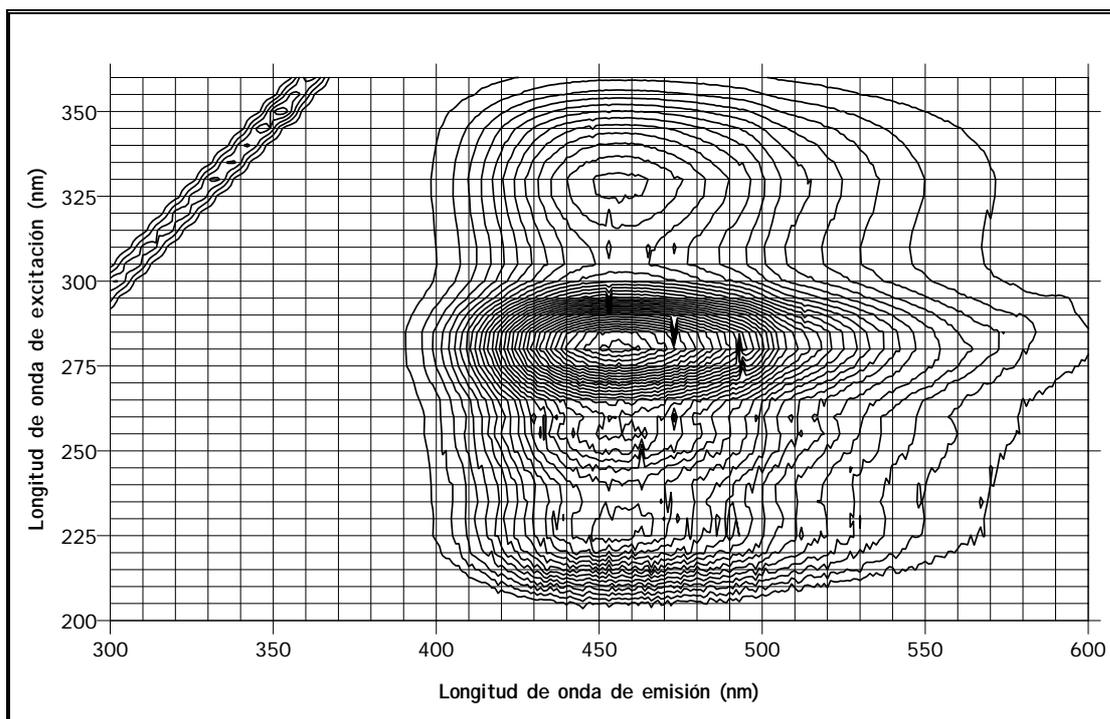


Figura II. 22.-Mapa de contorno para el Ofloxacino a pH = 7.4, [OFLO]= 1.0 µg/mL.

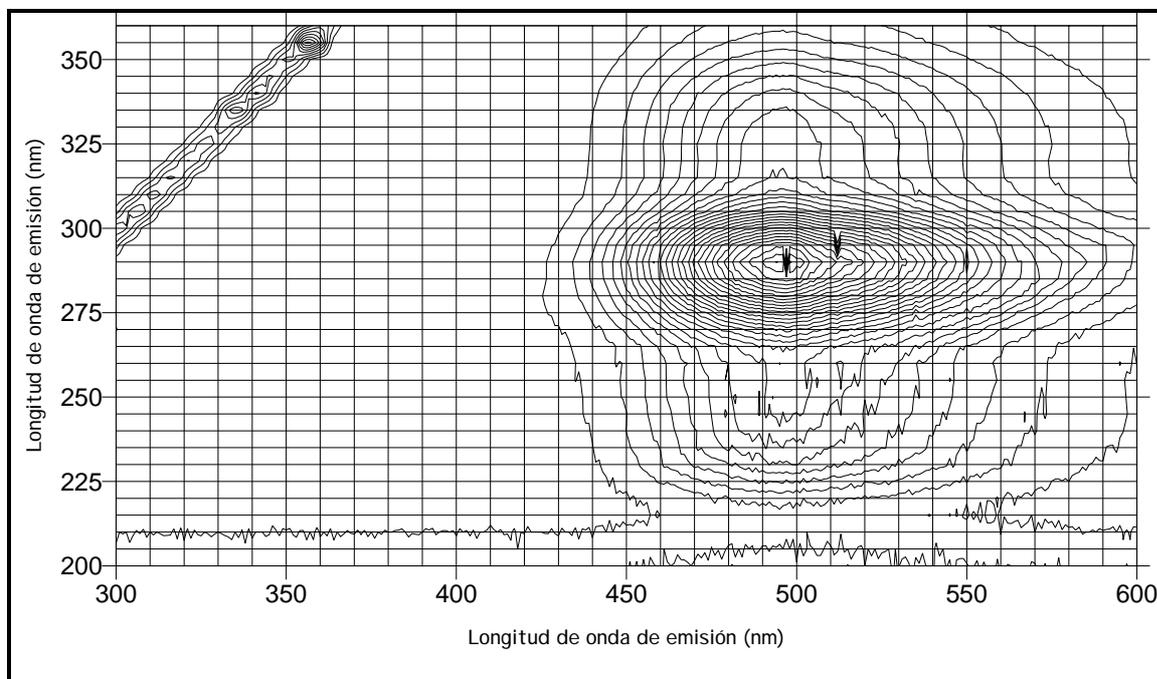


Figura II. 23.-Mapa de contorno para el ofloxaciono a pH=4.0. [Oflo] = 1.0 µg/mL.

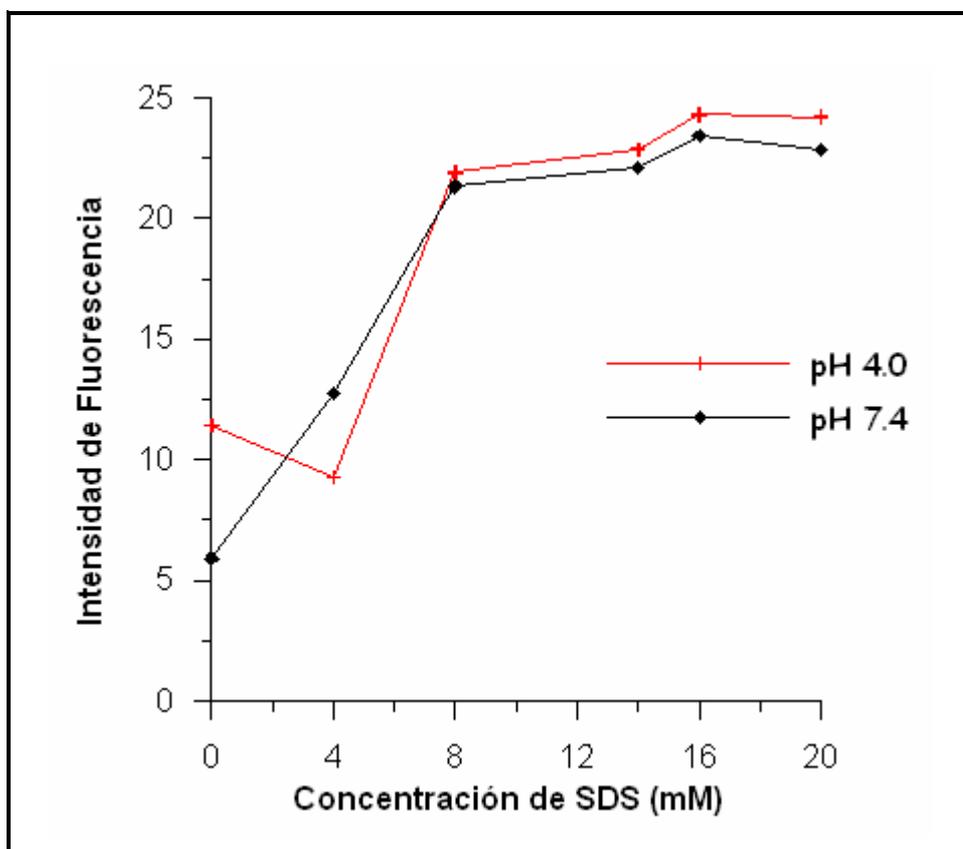
Como en los analitos anteriores, vemos que en el medio más ácido, sólo tenemos un máximo de excitación y emisión, el de excitación a 290 nm y el de emisión en 495 nm. A pH neutro, se observan dos máximos de excitación, el primero de ellos a 280 nm, que es el de mayor intensidad y el segundo a 330 nm de menor intensidad. El máximo de emisión aparece a 458 nm. Se aprecia, por tanto como a pH ácido se produce un notable desplazamiento batocrómico en el máximo de emisión.

Efecto de la adición de un agente surfactante

Se estudió el efecto que ejerce en la fluorescencia la presencia en el medio de un agente tensoactivo. Al igual que en los casos anteriores se observa un incremento en la señal fluorescente, así como un ligero incremento del ruido en la señal.

Dado que la adición de tensoactivo, provoca un incremento de la intensidad de fluorescencia, se estudió que concentración era la adecuada para trabajar. Para ello, y al igual que en los casos anteriores, se prepararon diferentes muestras de la misma concentración de fármaco y diferente concentración de tensoactivo. La acidez del medio fue fijada mediante la adición del correspondiente tampón. La acidez del medio se fija una vez añadido el tensoactivo. Los resultados que se obtuvieron se recogen en la Figura

II. 24 .



II. 24.- Influencia de la concentración de SDS. [OFLO]=1.0 $\mu\text{g/mL}$ V=530v

Como vemos en la figura anterior, por encima de 8 mM la intensidad de fluorescencia permanece constante. Establecemos como concentración de trabajo la de 12 mM, para situarnos en la mitad de la meseta, y no trabajar al límite de la concentración micelar crítica.

Efecto de la adición de agentes oxidantes

Se ensayó el efecto que ejerce a la fluorescencia la adición de una mezcla de yodo/yoduro potásico (2% I_2/KI en agua), en medio básico fijado con hidróxido sódico. Al igual que en los casos anteriores, al adicionar la mezcla oxidante se produce una pérdida de la coloración típica de ésta, lo cual nos hace pensar en la existencia de un proceso químico. Esta mezcla oxidante produce un

incremento paulatino de la señal fluorescente, como podemos ver a continuación, en la Figura II. 25.

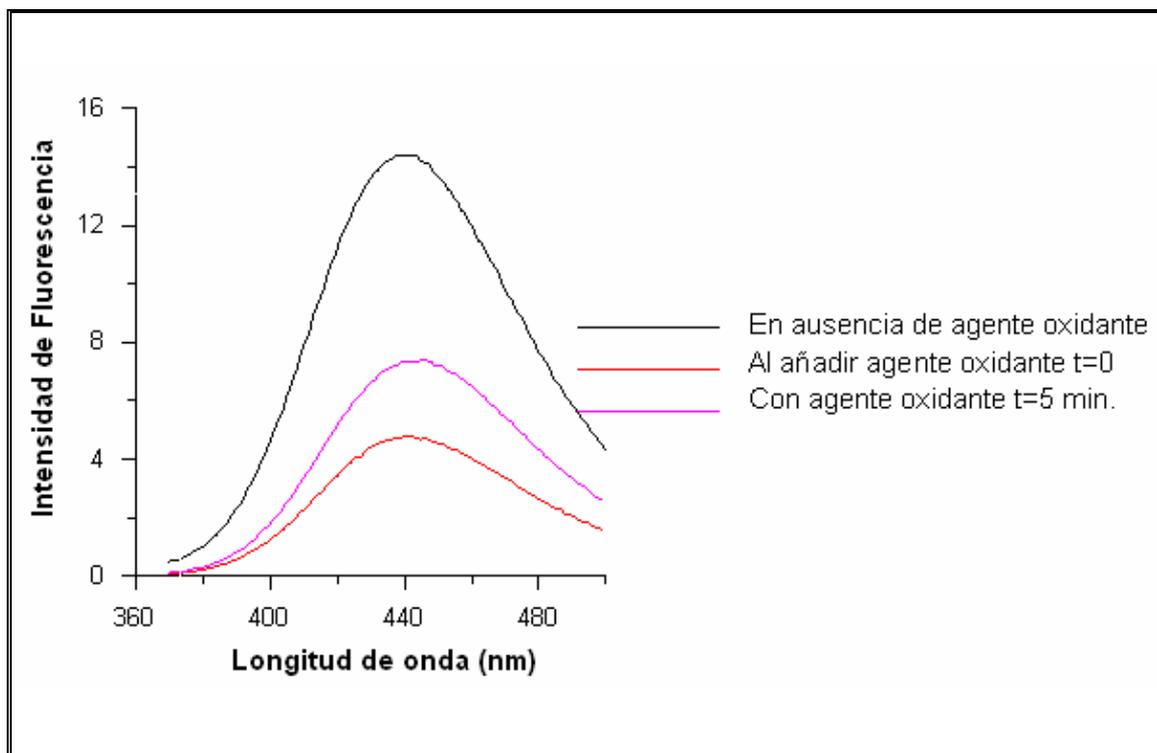


Figura II. 25.- Espectro de emisión de ofloxacino en medio básico; en presencia de I_2/I^- ; a tiempo de reacción 0 y 5 minutos. [OFLO]= 2.0 $\mu\text{g/mL}$ (V=650 V)

Se realizó el mismo estudio pero utilizando como agente permanganato potásico, fijando la acidez del medio a un pH=5.5. La concentración final de permanganato en la cubeta de medida es de 0.1 mM.

Las conclusiones que se sacaron de este estudio son similares a las obtenidas con el otro agente oxidante. Se produce un incremento de la señal con el tiempo.

Finalmente, se utilizó peróxido de hidrógeno como agente oxidante. Para ello se preparó una disolución diluida de peróxido, de modo que en la cubeta al añadir 0.1 mL quedase una concentración del 0.5%. Es necesario fijar la acidez del medio en un valor de 5.0. Nuevamente lo que observamos es un suave aumento de la fluorescencia con el tiempo.

Podemos concluir que en todos los casos se produce reacción que será estudiada posteriormente desde un punto de vista cinético, tanto para el ofloxacino, como para los otros dos derivados fluoroquinolónicos anteriormente mencionados.

Efecto de la irradiación externa

Se realizaron también estudios del efecto que produce una irradiación externa del analito. Para ello se prepararon muestras de analito de concentración 1.0 ng/L, y se irradiaron durante 5 minutos, registrando posteriormente los correspondientes espectros de excitación y emisión. Se observó que se produce un incremento de la señal fluorescente.

Dado que se produce un incremento de la sensibilidad, se estudió la influencia del tiempo de irradiación, con el objetivo de encontrar el tiempo de irradiación óptimo. El resultado fue similar a los descritos para enoxacino y norfloxacino.

4. Estudio de las propiedades analíticas del Ciprofloxacino

Estudios fluorimétricos

Comportamiento frente a diferentes disolventes

Para determinar las propiedades espectrales del analito se registraron los espectros de emisión y excitación en diferentes disolventes. Se ensayaron los mismos disolventes que se utilizaron para los casos anteriores.

En la siguiente figura se muestran los diferentes espectros de excitación y emisión utilizando los diferentes disolventes.

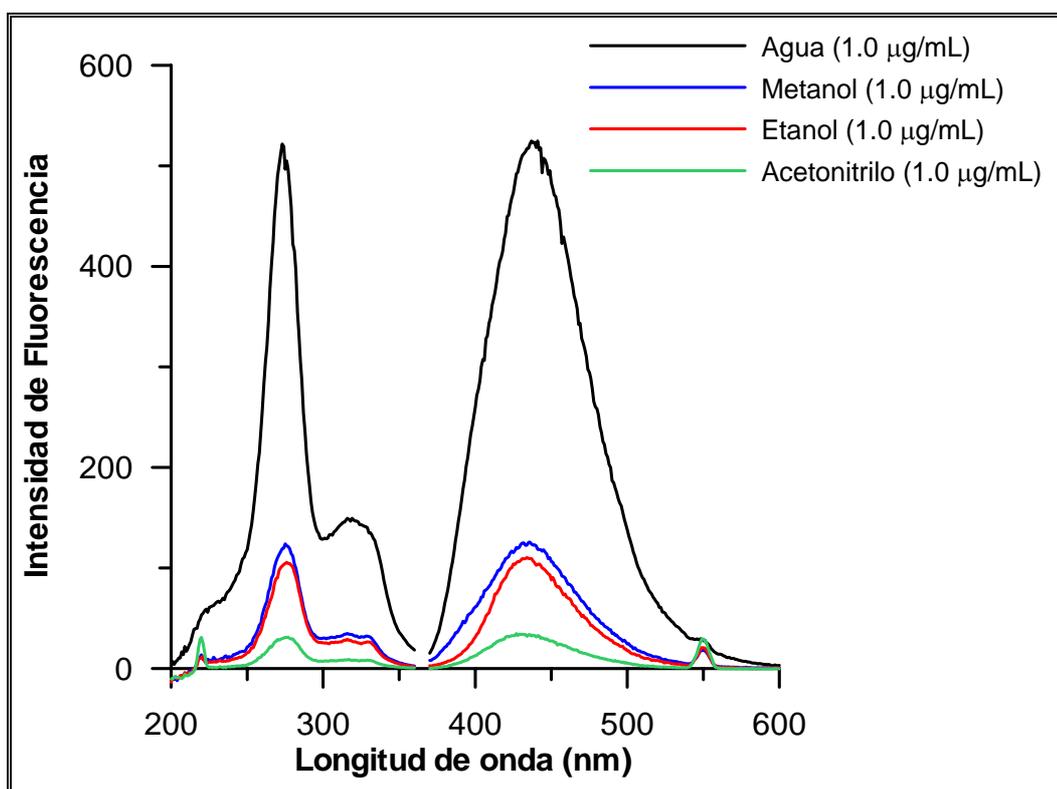


Figura II. 26.- Espectros de emisión y excitación del ciprofloxacino en diferentes disolventes (V=710)

Al igual que en los casos anteriores, el ciprofloxacino presenta su mayor fluorescencia en medio acuoso. En metanol la señal fluorescente, es más intensa que en etanol. Finalmente, el disolvente en el cual el principio activo presenta menor sensibilidad es el acetonitrilo.

Aunque es en agua donde el analito presenta mayor señal fluorescente, el problema radica en la etapa de disolución; ya que el analito presenta una baja solubilidad en agua, además la estabilidad de las disoluciones concentradas de ciprofloxacino en agua es baja. Decidimos disolver el ciprofloxacino en etanol, con objeto de preparar las disoluciones concentradas, y preparar las disoluciones diluidas en agua.

El estudio de la estabilidad de las disoluciones concentradas de ciprofloxacino en etanol, nos indicó que esta es estable al menos durante 15 días.

Influencia de la acidez del medio

A partir de la disolución concentrada de etanol, se preparó la correspondiente disolución diluida en agua. Se fijó la fuerza iónica mediante la adición de una disolución de nitrato de sodio, de forma que la concentración de ésta en la disolución final fuese de 0.1 M. El pH se fue modificando mediante la adición de pequeños volúmenes de disoluciones concentradas de hidróxido sódico o ácido clorhídrico. En la Figura II. 27 podemos ver diferentes espectros a distintos valores de pH.

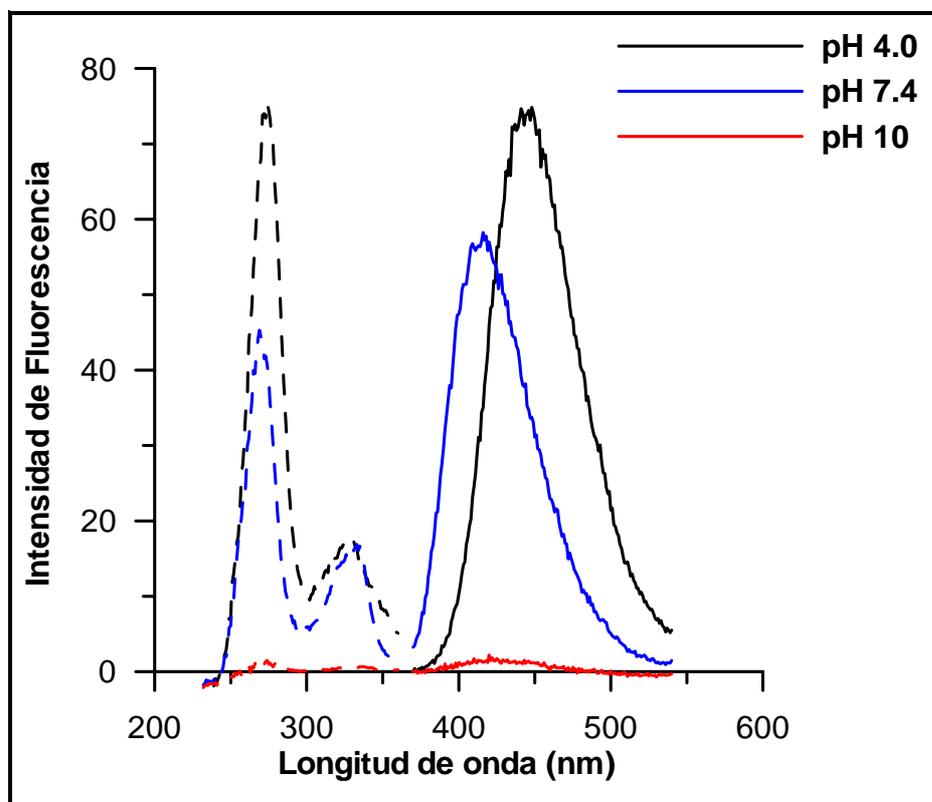


Figura II. 27.- Espectros de emisión y excitación para el ciprofloxacino a diferentes pH. [CIPRO] = 0.1 $\mu\text{g/L}$. V = 710v.

Observamos como el máximo de excitación que aparece sobre los 270 nm permanece constante prácticamente para los tres valores de pH. En cuanto a los espectros de emisión se observa que a valores de pH básicos y neutros, la intensidad de fluorescencia es inferior que a valores de pH ácidos. Es a pH ácidos donde se observa mayor intensidad de fluorescencia.

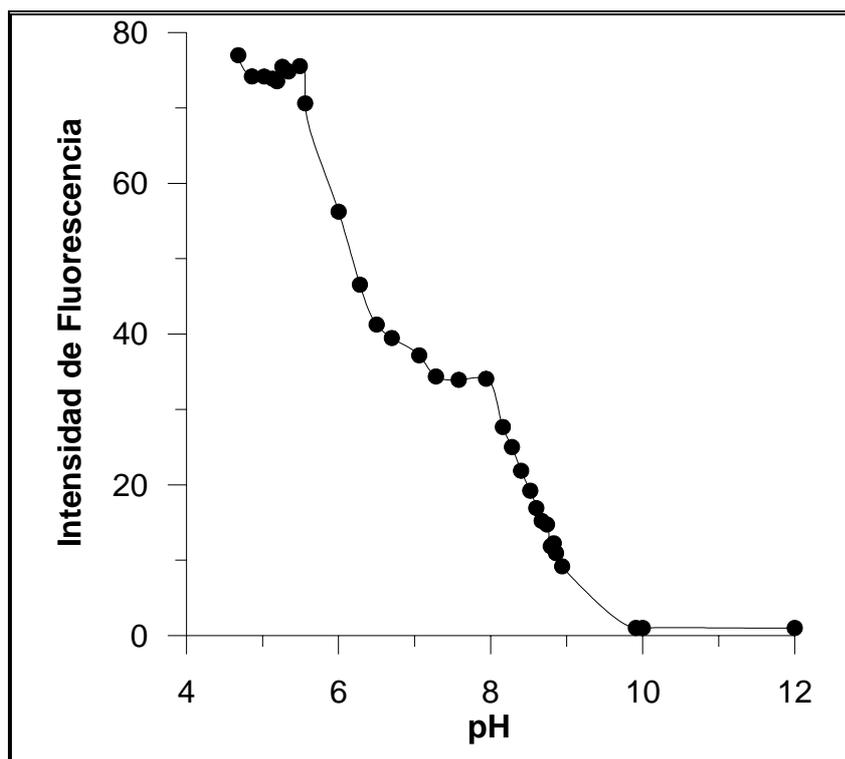


Figura II. 28.- Variación de la intensidad de fluorescencia en función del pH. [CIPRO] = 0.1 $\mu\text{g/mL}$, λ_{exc} = 274 nm, λ_{em} = 440 nm, $V=710\text{v}$.

Con los datos obtenidos, se han calculado² los valores de pK, obteniéndose los siguientes valores de 6.02 y 8.58.

Para fijar la acidez del medio, es conveniente emplear disoluciones reguladoras de pH, por lo que es necesario comprobar el efecto que ejercen estas disoluciones en la señal del analito, así como la influencia de la concentración de la misma. Para fijar el medio ácido, se emplea el tampón acético-acetato, mientras que para fijar el medio a pH neutro, se empleó el tampón Tris-hidroximetil aminometano / HCl.

En primer lugar se prepararon dos disoluciones de la misma concentración de ciprofloxacino, fijando el pH a 4 y 7 mediante la adición del correspondiente volumen de disolución de ácido clorhídrico o hidróxido sódico, respectivamente, y otra mediante la adición de un volumen de disolución tampón. Se observó que no se producían variaciones importantes ni en la

morfología de los espectros, ni en la intensidad de los mismos. Seguidamente se comprobó la influencia de la concentración de la disolución tampón.

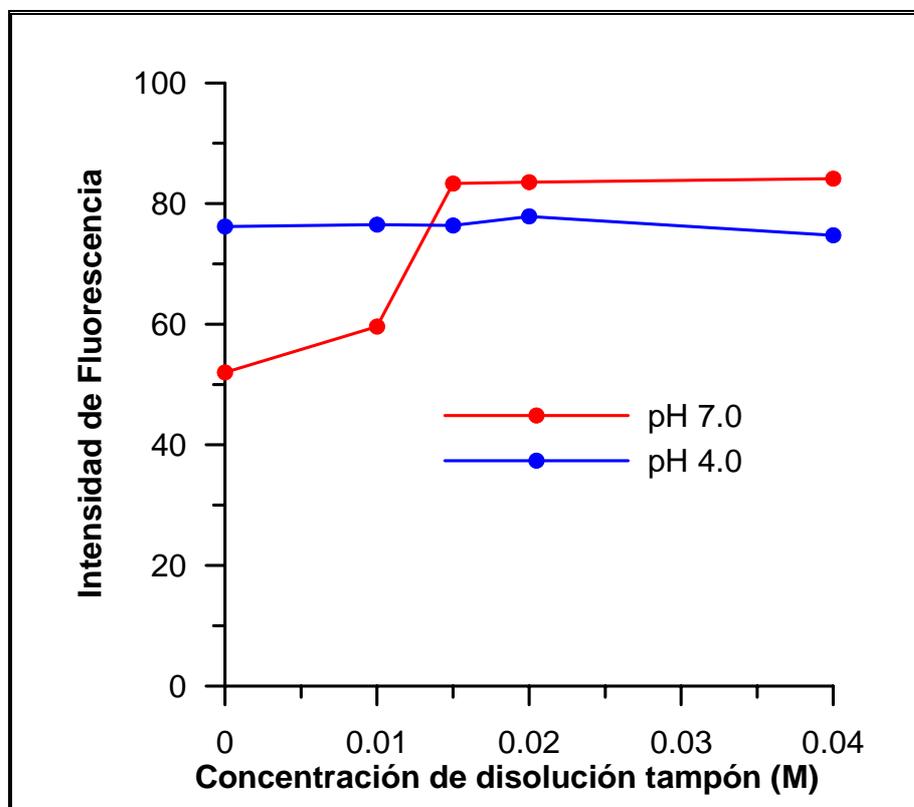


Figura II. 29.- Variación de la intensidad de fluorescencia en función de la concentración de disolución tampón.

Se establece como concentración óptima de tampón la de 0.02 M.

Finalmente, para terminar los estudios relativos a la acidez del medio, se registraron los correspondientes espectros tridimensionales a los valores de pH 7.0 y 4.0, como podemos ver en las Figuras II.32 y 33.

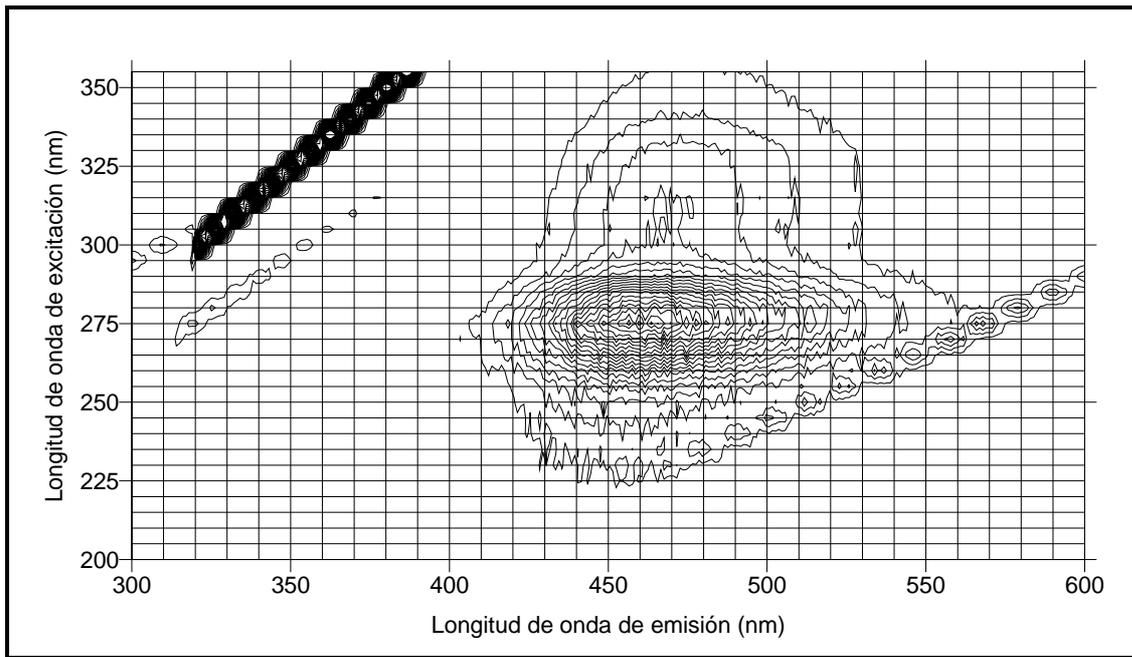


Figura II. 30.- Mapa de contorno para ciprofloxacino a pH 4.0. [CIPRO]= 0.1 $\mu\text{g/mL}$.

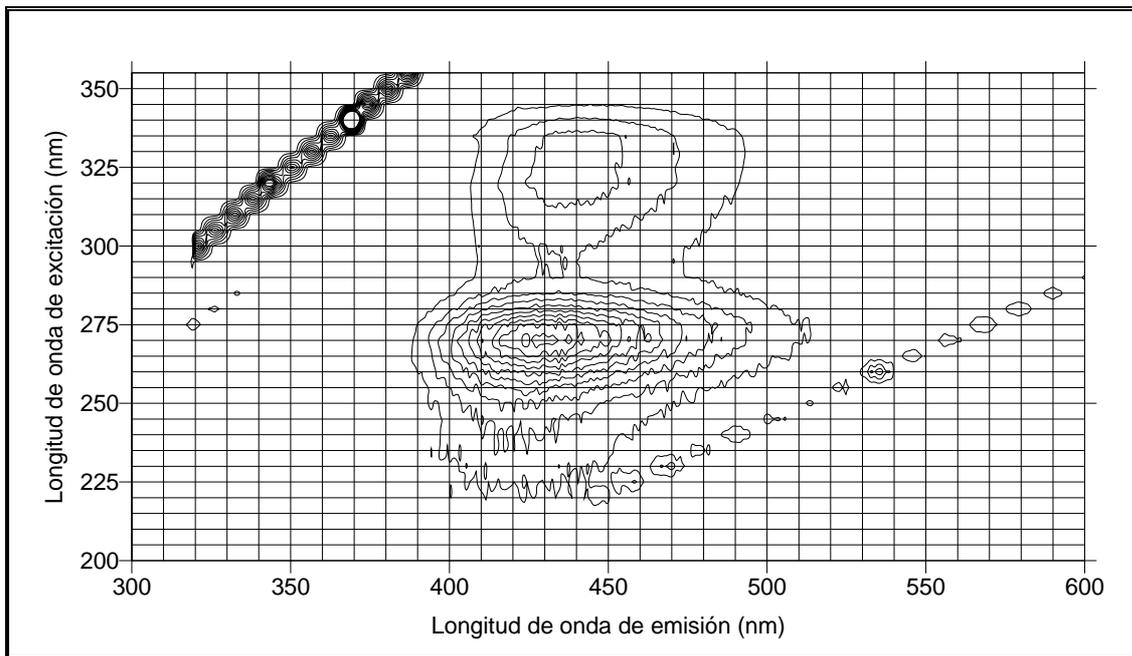


Figura II. 31.- Mapa de contorno para ciprofloxacino, pH 7.0. [CIPRO]= 0.1 $\mu\text{g/mL}$.

Efecto en la adición de un agente surfactante

Una vez establecido como mejor disolvente de trabajo el agua, y la influencia de la acidez del medio, se estudió el efecto que ejerce en la fluorescencia la presencia de un agente surfactante. Al igual que en los casos anteriores se observa un incremento en la señal fluorescente.

Dado que la adición de tensoactivo, provoca un incremento de la intensidad de fluorescencia, se estudió que concentración era la adecuada para trabajar. Para ello, y al igual que en los casos anteriores, se prepararon diferentes muestras de la misma concentración de ciprofloxacino y diferentes concentraciones de tensoactivo. La acidez del medio fue fijada mediante la adición del correspondiente tampón, y se establece una vez añadido el tensoactivo. Los resultados obtenidos se recogen en la siguiente figura.

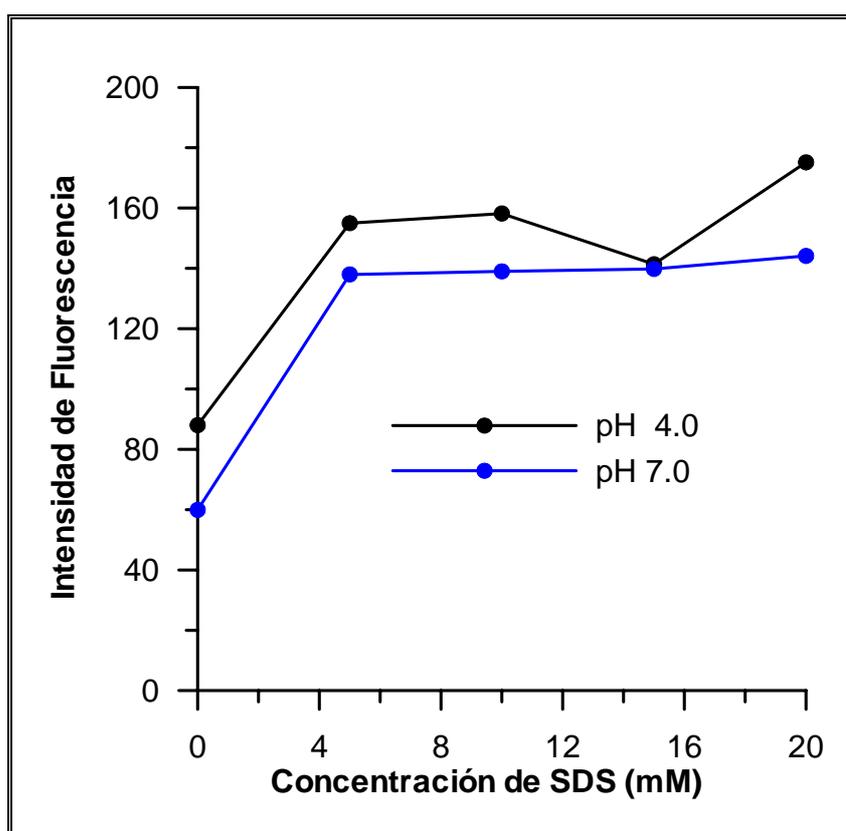


Figura II. 32.- Variación de la intensidad de fluorescencia en función de la concentración de agente surfactante añadido.

5. Estudio de las propiedades analíticas del Enrofloxacin

Estudios fluorimétricos

Comportamiento frente a diferentes disolventes

Para determinar las propiedades espectrales del analito se registraron los espectros de emisión y excitación en diferentes disolventes. Se ensayaron los mismos disolventes que se utilizaron para los casos anteriores.

En la siguiente figura se muestran los diferentes espectros de excitación y emisión utilizando los diferentes disolventes.

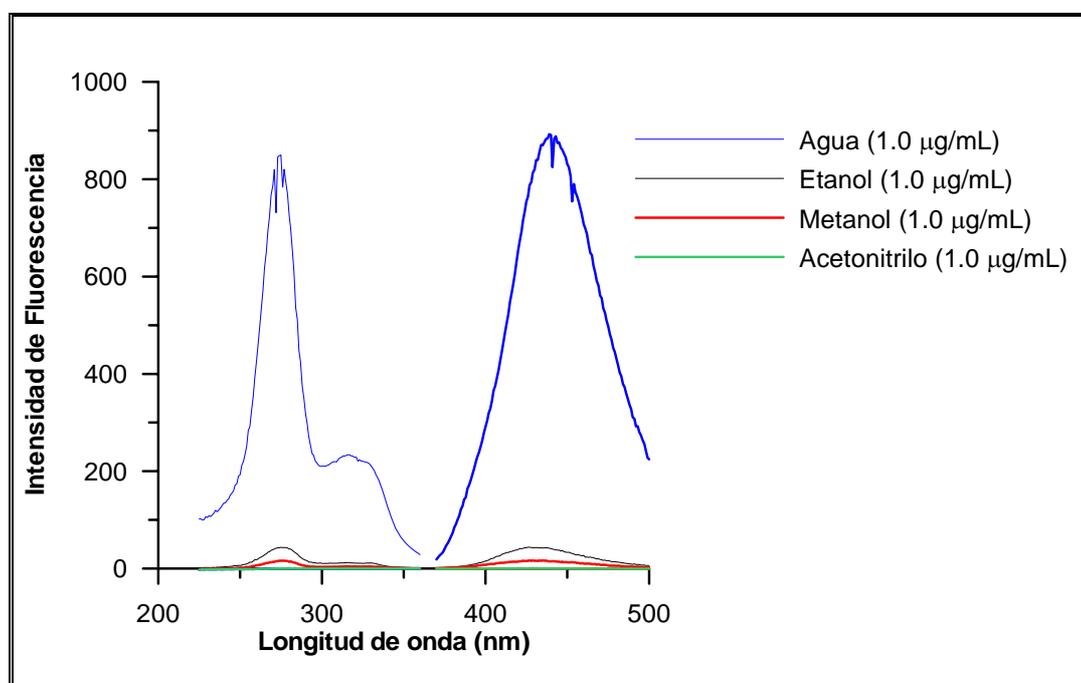


Figura II. 33.- Espectros de emisión y excitación para el enrofloxacin, en diferentes disolventes. V= 750 v.

Para el enrofloxacin, se hace más evidente la diferencia existente entre la utilización de agua como disolvente, y cualquiera de los otros disolventes orgánicos empleados. Para una misma concentración, observamos que en agua el principio activo presenta 40 veces más fluorescencia. En acetonitrilo el analito carece prácticamente de fluorescencia, y las diferencias que se observan entre el metanol y etanol son muy ligeras. Pero al igual que en los casos anteriores, la

mayor solubilidad y estabilidad de las disoluciones etanólicas, hace que empleemos este disolvente para preparar las disoluciones concentradas, pero las posteriores disoluciones de trabajo serán en agua.

Se estudió la estabilidad, tanto de las disoluciones concentradas como de las diluidas, siendo para las primeras de al menos 15 días, y para las segundas de 5 horas.

Influencia de la acidez

Al igual que en los casos anteriores, a partir de la disolución concentrada en etanol, se preparó la correspondiente disolución diluida acuosa de concentración 0.1M. Se fijó la fuerza iónica de la disolución, mediante la adición de un volumen de disolución de nitrato de sodio, tal que la concentración final de la sal fuese de 0.1 M. El pH se fue modificando mediante la adición de volúmenes correspondientes de disoluciones de hidróxido sódico y ácido clorhídrico de concentración adecuada.

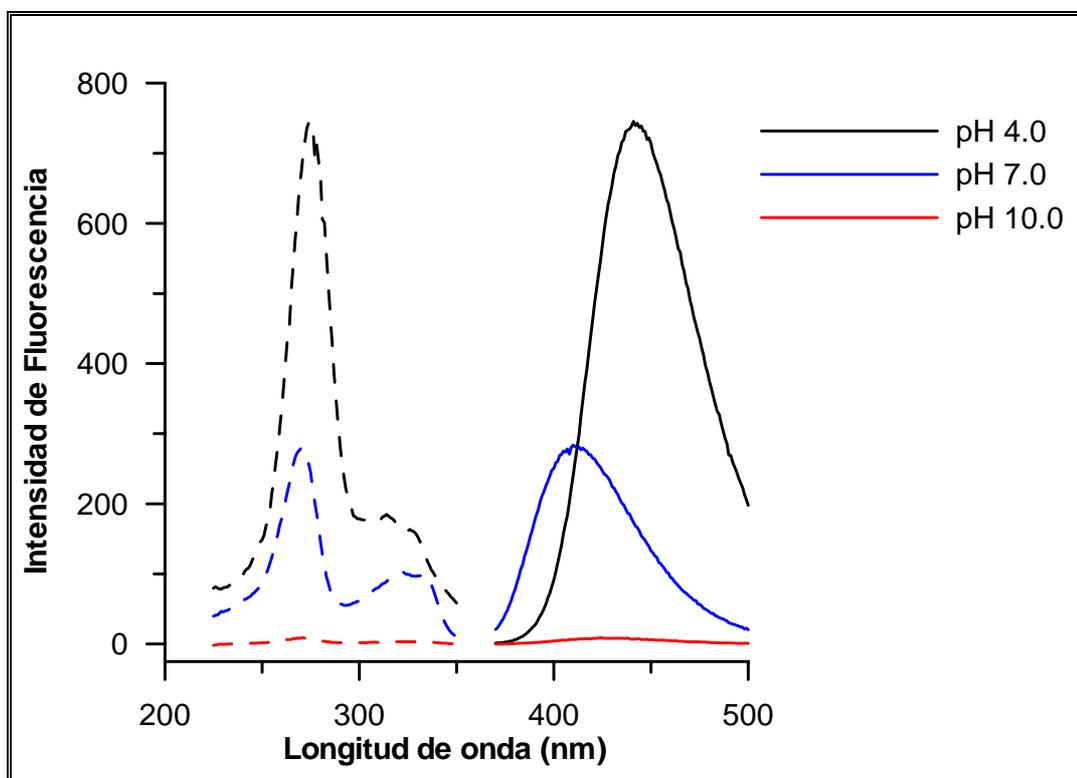


Figura II. 34.- Espectros de excitación y emisión para enrofloxacino a diferentes valores de pH. [ENRO] = 1.0 µg/mL, V=710v.

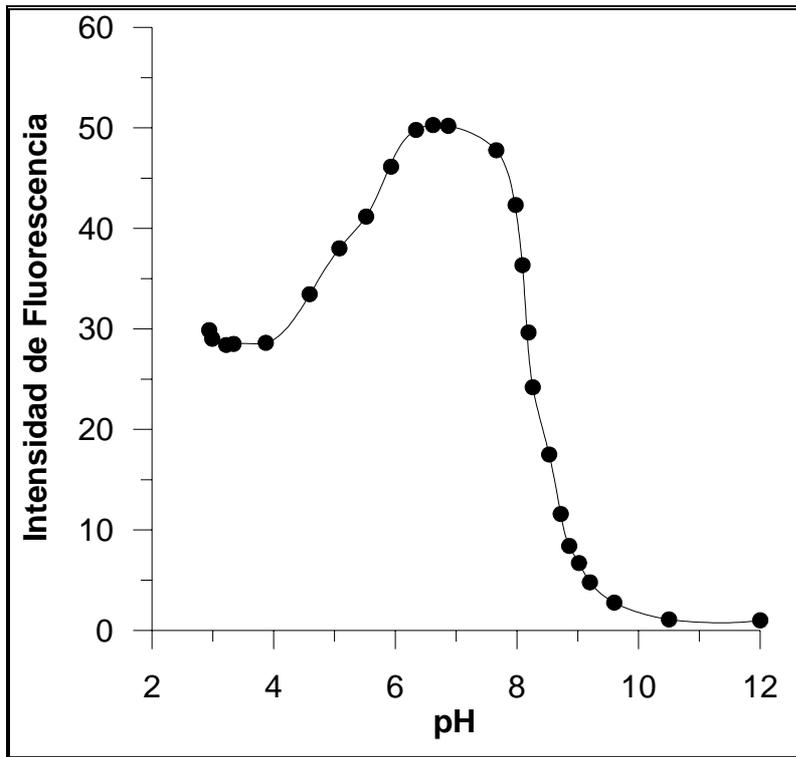


Figura II. 35.- Variación de la intensidad de fluorescencia en función del pH. [ENRO] =0.1 µg/mL.

Al igual que en los analitos anteriores, se ha calculado los valores de pK, de acuerdo a los datos experimentales recogidos. Los resultados obtenidos son de 5.29 y de 8.26 respectivamente.

Influencia de la concentración de tampón

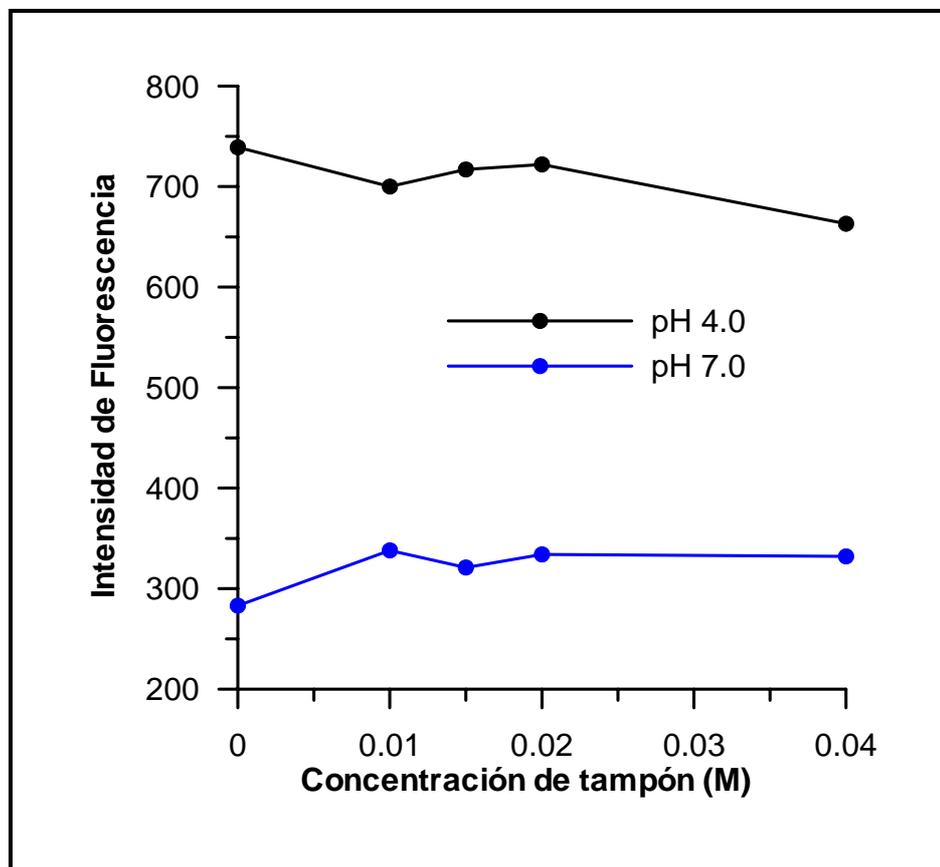


Figura II. 36.- Influencia de la concentración de tampón AcH/Ac⁻ y TRIS | HCl

Al igual que en los casos anteriores, fijamos como óptima una concentración de tampón de 0.02 M.

Se registraron los espectros de emisión-excitación fluorescente para los dos valores de pH seleccionados. En la Figura II. 37 y Figura II. 38 podemos observar los mapas de contornos para ambos casos.

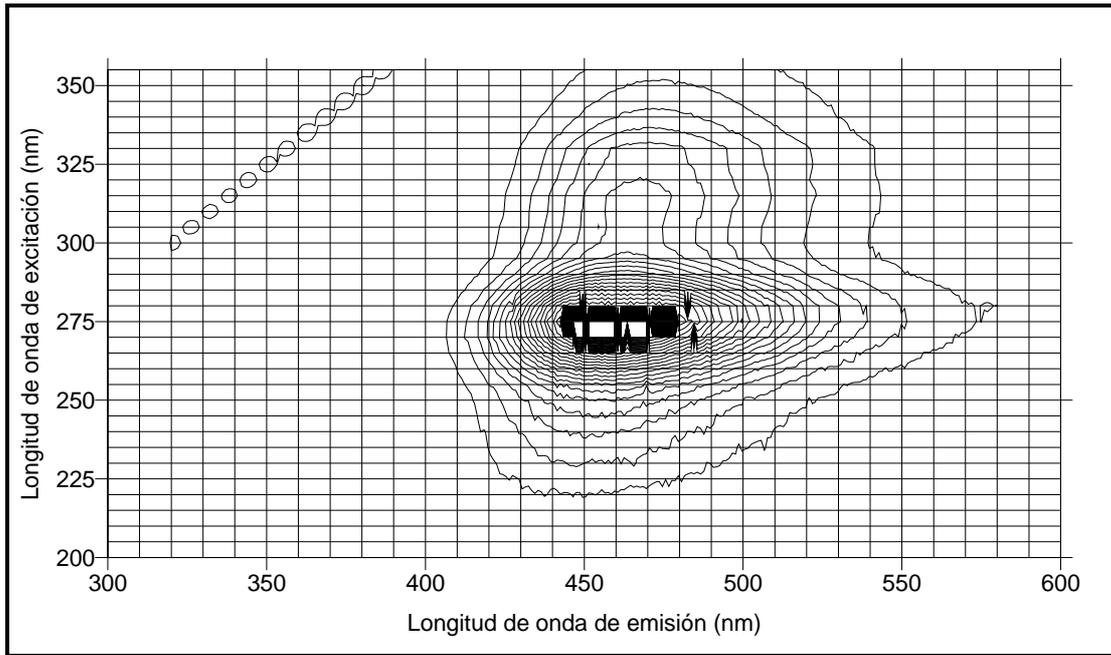


Figura II. 37.- Mapa de contorno para enrofloxacino a pH 4.0. [ENRO] = 1.0 $\mu\text{g/mL}$. V=710v.

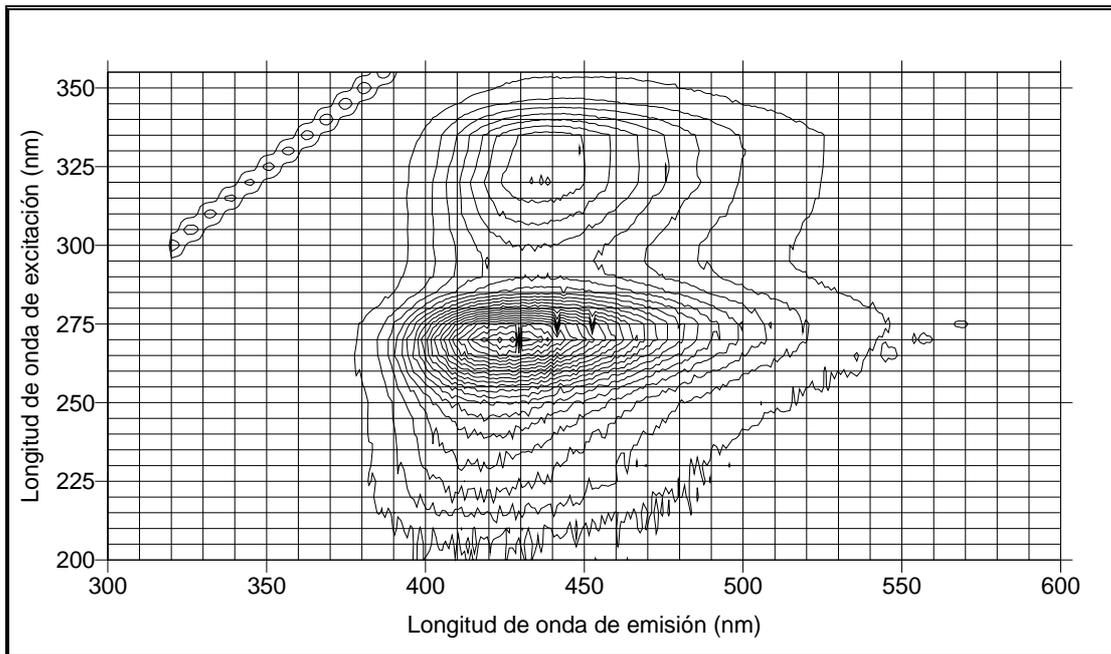


Figura II. 38.- Mapa de contorno para enrofloxacio, pH 7.0. [ENRO] = 1.0 $\mu\text{g/mL}$. V=710v

Efecto de la adición de un agente surfactante

Se estudió el efecto que ejerce en la fluorescencia la presencia en el medio de un agente tensoactivo. Al igual que en los casos anteriores se observa un incremento en la señal fluorescente, así como un desplazamiento de la misma; tanto a valores de pH ácidos como neutros.

Al igual que en los casos anteriores se ha estudiado el efecto que ejerce el *dodecilsulfato sódico* (SDS).

Para determinar la concentración óptima de tensoactivo, se ha estudiado que cambios se producen en la intensidad de fluorescencia, diferentes concentraciones de SDS, tanto para pH neutros como ácidos, empleando para ello la correspondiente disolución tampón. Los resultados se muestran en la siguiente figura.

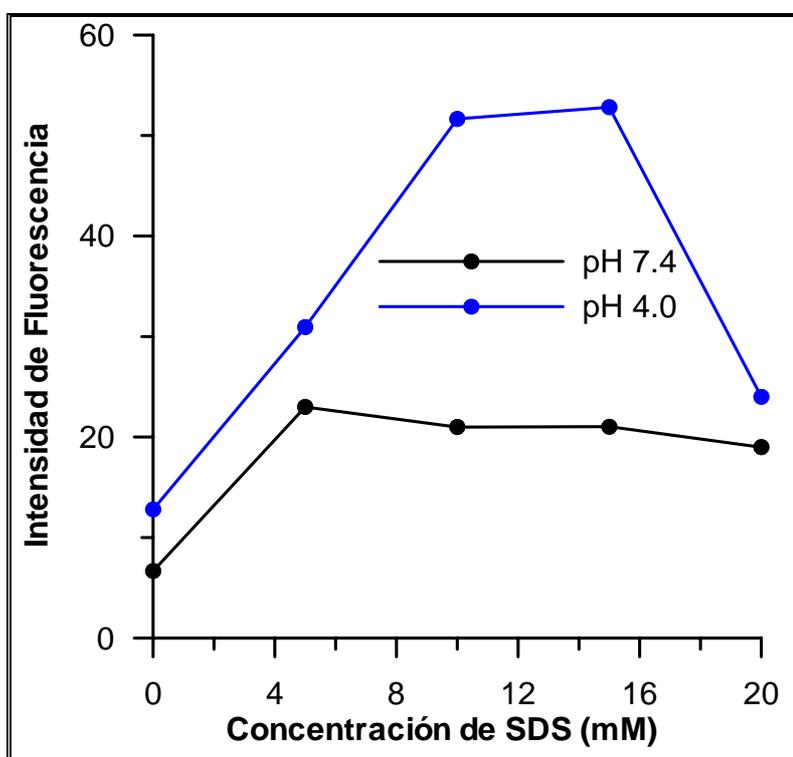


Figura II. 39.- Variación de la intensidad de fluorescencia en función de la concentración de tensoactivo.

6. Resumen

En el presente capítulo se han estudiado cuales son las características fluorescentes de cinco antibióticos, norfloxacin, enoxacin, ofloxacin, ciprofloxacino y enrofloxacin, pertenecientes a la familia de las fluoroquinolonas.

Hemos concluido que el disolvente óptimo de trabajo es el agua, pero que previamente las muestras deben ser disueltas y conservadas en etanol, siendo la estabilidad de estas de al menos quince días.

Se ha comprobado que se puede trabajar a valores de pH en torno a 4.0 y 7.4; y que estos medios pueden fijarse con la utilización de disoluciones reguladoras de pH acético-acetato o trisHCl, en función del caso.

Finalmente, se ha determinado que al incrementar la rigidez del medio, utilizando un agente surfactante, como el dodecilsulfato sódico, se produce un incremento de la sensibilidad, siendo la concentración adecuada del mismo de 12.0 mM, ligeramente superior a la Concentración Micelar Crítica de este tensoactivo en agua, en todos los casos.

También se han llevado a cabo diferentes estudios, tales como irradiación externa y reacción con agentes oxidantes, con el objetivo de aportar datos de interés analítico para posteriores estudios.

Capítulo III.

**Determinación simultánea de norfloxacin, enoxacin y
ofloxacin en sus mezclas sintéticas
y en fluidos biológicos.**

1. Introducción

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 é y , de manera que y se emplea para predecir x . 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.

Mediante los métodos de calibración multivariante^{1,2,3} es posible obtener información cuantitativa selectiva a partir de datos poco selectivos, posibilitándose la determinación simultánea de diversos componentes en muestras complejas⁴⁻⁹. 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, aspectos ambos de gran importancia en los análisis de rutina o de control sobre gran cantidad de muestras análogas. Además, la calibración multivariante ha permitido el desarrollo de nuevos instrumentos analíticos¹⁰.

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.

¹ H. Martens y T. Naes ; *Multivariate calibration*; John Wiley and Sons. Chichester, 1989.

² Beebe, K.R., Kowalski, B.R., *Analytical Chemistry*, 59, 1007A, 1989.

³ Thomas, E.V., Haaland, D.M., *Analytical Chemistry*, 62, 1091, 1990.

⁴ Ketterer, M.E., Rescht, J.J., Peters, M.J., *Analytical Chemistry*, 61, 2031, 1989.

⁵ Janatch, G. , Kruse-Jarres, J.D., Marbach, R., Heise, H. M., *Analytical Chemistry*, 61, 2016, 1989.

⁶ Otto, M., Thomas, J.D.R., *Analytical Chemistry*, 57, 2647, 1985.

⁷ Lindberg, W., Ohman, J., Wold, S., Martens, H., *Analytica Chimica Acta*, 174, 41 1985.

⁸ Carey, W.P., Wangen, L.E., Dyke, J.T., *Analytical Chemistry*, 61, 1667, 1989.

⁹ Otto, M., Wegscheider, W., *Analytical Chemistry*, 57, 63, 1985.

¹⁰ Stark, E., Luchter, K., Margoshes, M., *Applied Spectroscopy Rev.*, 22, 335, 1986.

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.

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

- **Aplicables a sistemas lineales:** a) Regresión lineal múltiple (**MLR**); b) Análisis multicomponente clásico (Classical Least Squares, **CLS**); c) Regresión inversa por mínimos cuadrados (Inverse Least Squares, **ILS**); d) y el novedoso Análisis lineal híbrido (**HLA**).
- **Aplicables tanto a sistemas lineales como no lineales**¹¹⁻¹³ : a) Regresión por componentes principales (Principal Component Regression, **PCR**); b) Regresión por mínimos cuadrados parciales (Partial Least Squares, **PLS**). Otros de más reciente incorporación son: a) **ACE** (Alternating Conditional Expectations); b) **LWR** (Locally Weighted Regression); c) **MARS** (Multivariante Adaptive Regression Splines); d) **PPR** (Projection Pursuit Regression); e) **NN** (Neural Networks) de aplicación a sistemas no lineales.

¹¹ Tauler, R., Casassas, E., *Analytica Chimica Acta*, 223, 257, 1989

¹² Haaland, D.M., Thomas, E.V., *Analytical Chemistry*, 60, 1193, 1988

¹³ Wold, S., *Technometrics*, 20, 397, 1978

Los procedimientos utilizados 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 problemas de concentración desconocida.

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

Cuando se realiza la calibración se debe especificar el número de componentes que se deseen predecir y la concentración de cada uno de ellos en los patrones. También se debe elegir la zona de señales que se va a usar en el análisis. Una vez 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 quedarán 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.

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 **set de calibración**. Dicho set 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 set 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 set de calibración, es decir, la bondad como herramienta de predicción del modelo va a depender en gran manera del diseño del grupo (set) de calibración. Dicho set de calibración debe estar compuesto por muestras patrón de mezclas de componentes en concentraciones tales que engloben a los posibles problemas y, por otra parte, distribuidas de forma estadísticamente correcta. Se emplean diversos procedimientos de diseño 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, **set de predicción**, tras obtener las correspondientes variables dependientes.

Podemos hacer un tratamiento matemático que nos permita visualizar los diferentes métodos de calibración que actualmente tienen una aplicación más extendida. Considerando un método espectroscópico molecular tal como absorción o fluorescencia, la notación matemática utilizada es la siguiente: las matrices se expresan en mayúsculas y negrilla; los vectores en minúsculas y negrilla, y los escalares en minúscula; para la traspuesta de una matriz se emplea el exponente T, y para la inversa el -1.

Partimos de considerar los datos como 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 **A**, de dimensiones **Ixn**, 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 **C**, de dimensiones **Ixm**, en la que las filas son las concentraciones de los diferentes componentes en el set de

que expresado en forma matricial: $\mathbf{A} = \mathbf{K}\mathbf{C}$; donde \mathbf{A} es la matriz de absorbancias, de dimensiones $(n \times 1)$, \mathbf{K} es la matriz de las constantes de proporcionalidad, de dimensiones $(n \times l)$, y \mathbf{C} la matriz de concentraciones, de dimensiones $(l \times 1)$.

Si se quiere considerar una ordenada en el origen para el ajuste, se puede aumentar la dimensión de las matrices y añadir a la matriz \mathbf{K} una columna de unos y considerar una concentración C_0 , que aporte una medida de la desviación respecto al cero. De esta forma, las matrices quedan:

$$\mathbf{A} = \begin{pmatrix} A_0 \\ A_i \\ A_p \end{pmatrix} \quad \mathbf{k} = \begin{pmatrix} 1K_{11} K_{12} K_{13} \dots K_{1n} \\ 1K_{j1} K_{j2} K_{j3} \dots K_{jn} \\ 1K_{p1} K_{p2} K_{p3} \dots K_{pn} \end{pmatrix} \quad \mathbf{C} = (C_0 \dots C_1 \dots C_n) \quad \text{Ecuación 4}$$

Los valores de la matriz \mathbf{K} se pueden calcular a partir de los espectros de los componentes puros presentes en la mezcla, de manera que, si el camino óptico es constante, cada columna de la matriz es el espectro del componente puro patrón, dividido por su concentración.

La suma de los cuadrados de los errores residuales (SCR) vale:

$$\text{SCR} = \sum_{j=1}^p (A_j - \hat{A}_j)^2 = \sum_{j=1}^p \left(A_j - \sum_{i=1}^n K_{ji} \hat{C}_i \right)^2 \quad \text{Ecuación 5}$$

donde \hat{A}_i y \hat{C}_j indican, respectivamente, absorbancia y concentraciones estimadas.

Las concentraciones de los analitos presentes en la mezcla se calculan mediante Regresión por Mínimos Cuadrados que minimiza SCR. Expresando la regresión en forma matricial, las concentraciones calculadas valen:

$$\mathbf{c} = (\mathbf{K}^T \mathbf{K})^{-1} \mathbf{K}^T \mathbf{A} \quad \text{Ecuación 6}$$

❖ **Métodos CLS** (Análisis multicomponente clásico)

Si tenemos dos componentes A y B, siendo ambos especies absorbentes, la absorbancia de la mezcla a una longitud de onda determinada, y considerando las señales aditivas de acuerdo a un buen cumplimiento de la Ley de Beer vendrá dada por:

$$A_{\lambda_i} = K_{A,\lambda_i} C_A + K_{B,\lambda_i} C_B + E_{\lambda_i} \quad \text{Ecuación 7}$$

siendo: A_{λ_i} , la absorbancia de la mezcla a la longitud de onda λ_i ; K_{A,λ_i} y K_{B,λ_i} , los coeficientes de absorptividad para los componentes A y B a λ_i ; y E_{λ_i} , el error residual entre la absorbancia correspondiente a la línea de mínimos cuadrados y la absorbancia real. La aproximación más sencilla consistiría en utilizar tantas ecuaciones como componentes, sin embargo se suelen emplear más longitudes de onda con objeto de minimizar el ruido, obteniendo un valor promedio de varias señales. Se suele emplear el espectro completo (full spectrum) o cualquier otro tipo de señal analítica total, o al menos toda aquella parte de la señal que proporcione información diferencial entre los componentes a determinar.

Como consecuencia de lo anterior, el elevado número de ecuaciones aconseja el tratamiento matricial de las mismas. Las ecuaciones empleadas se pueden expresar como:

$$A(n, m) = K(n, l) C(l, m) + E(n, m) \quad \text{Ecuación 8}$$

donde **n** es el número de canales usados; **l** es el número de componentes de las mezclas y **m** es el número de espectros del set de calibración. Por tanto, las columnas de la matriz **A** son las señales para cada canal (por ejemplo, absorbancias a las longitudes de onda seleccionadas para cada espectro) del set de calibración, las columnas de **K** son los coeficientes de proporcionalidad (por ejemplo, coeficientes de absorptividad) para cada uno de los componentes a cada canal (a cada longitud de onda) y las columnas de **C** son las concentraciones de los componentes de la mezcla para cada una de las muestras empleadas en el set de calibración.

Mediante álgebra matricial, se resuelven los sistemas de ecuaciones, obteniéndose así la matriz estimada de los coeficientes de absorptividad, **K**, (**Matriz K**) la cual se utilizará para la predicción. Es necesario incluir la información referente a cualquier causa de interferencia tanto química como instrumental, siendo ésta la mayor limitación del método. La omisión de la concentración de cualquier componente o interferencia hará que el modelo realice una modulación incorrecta y como consecuencia las predicciones serán a su vez incorrectas. Este tipo de modelo recibe el nombre de modelos **rígidos**.

❖ **Método ILS** (Regresión inversa por mínimos cuadrados).

Cuando se analizan muestras reales, en muchas ocasiones no es posible conocer la composición completa de las mismas, y aunque se conozca la información referente a determinados componentes puede no tener interés, por lo cuál su inclusión en el modelo solo logra complicar el cálculo sin aportar datos analíticos relevantes. Entonces, considerando el caso de componentes absorbentes, nos podemos plantear la ley de Beer en su denominada forma invertida donde: $\mathbf{C} = \mathbf{A} \mathbf{P} + \mathbf{E}$; siendo **C** y **A** los parámetros anteriormente mencionados, mientras que **P** es una matriz de los coeficientes de calibración desconocidos de los **m** componentes de las mezclas a las **p** longitudes de onda utilizadas y **E** es una matriz de errores aleatorios de concentración o residuales que no se ajustan al modelo. La concentración es función de la absorbancia a las longitudes de onda establecidas, y como consecuencia, este modelo resulta invariante respecto al número de componentes que se incluyan. Se puede calcular la matriz de coeficientes **P**, incluso sin conocer las concentraciones de todos los componentes.

Este tipo de proceso de calibración, es denominado **ILS** (o de **Matriz P**). Sus limitaciones fundamentales derivan del hecho de tener que usar un número de canales igual que el número de patrones usados en el set de calibración con objeto de mantener la dimensionalidad de la matriz y por otra parte evitar la colinealidad.

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...

❖ 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).

El proceso de descomposición se puede esquematizar indicando los pasos que el algoritmo matemático realiza sobre el set de calibración creado en la forma ya descrita. En primer lugar, calcula el espectro medio, con los espectros de las muestras que componen el set de calibración, a continuación lo compara con cada uno de los espectros individuales del set 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 loading*. Posteriormente, calcula la cantidad de vector loading que le corresponde a cada espectro individual en la calibración y al valor resultante se le denomina *score*. Calcula la contribución del loading a cada espectro de la calibración y la sustrae de cada espectro individual. Los espectros obtenidos los 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*, y en definitiva, en lugar de los datos de absorbancia, los espectros pueden representarse mediante sus respectivos *scores*.

El método PCA o Análisis de Componentes Principales (Principal Component Analysis)¹⁴⁻¹⁶ se puede matemáticamente desglosar como una descomposición de la matriz **A** de rango **m**, en una suma de matrices de rango **1** según:

$$A = M_1 + M_2 + M_3 + \dots + E_A \quad \text{Ecuación 9}$$

de modo que cada una se pueda escribir como producto de dos vectores: un vector *score* t_1 y un vector *loading* p_1 : $A = t_1 p_1^T + t_2 p_2^T + t_3 p_3^T + E_A$ o bien en la forma equivalente: $A = T \cdot P^T + E_A$

Es decir, la matriz **A** se expresa en un nuevo sistema ortogonal de variables en el que los *scores* (T) representan las coordenadas de cada punto en el nuevo sistema, y los *loadings* (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.

Tanto PCR como PLS, que se tratarán seguidamente, utilizan una etapa de PCA en la descomposición factorial

❖ Método PCR o regresión por componentes principales

PCR puede considerarse como un método híbrido, que combina algunas ventajas de los métodos CLS e ILS. Hace uso de los conceptos de descomposición espectral.

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.

¹⁴ Manne, R., *Chemometrics and Intelligent Laboratory System*, 2, 187, 1987

¹⁵ Lorber, A., Wangen, L., Kowalski, B.R., *Journal of Chemometrics*, 1, 19, 1987

¹⁶ Martens, H., Karstang, T., Naes, T., *Journal of Chemometrics*, 1, 201, 1987

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.

El modelo PCR, al igual que PLS, utilizan el método factorial PCA, para extraer información analítica relevante de la matriz de datos de calibración.

La matriz de datos **A (m,n)**, que se obtiene mediante el registro de la señal analítica, de **m** mezclas de composición conocida, a **n** diferentes longitudes de onda, se ordena según la siguiente expresión matricial:

$$A(m,n)=T(m,h) B(h,n) + E(m,n) \qquad \text{Ecuación 10}$$

donde **T(m,h)** es la matriz de escalares (scores) **B(h,n)** es la matriz de vectores loadings, y **E(m,n)** la matriz de errores espectrales residuales, siendo **h** el número de componentes principales.

De acuerdo con lo anterior, para un determinado componente, en la etapa de calibración tenemos:

$$c(m,1)=T(m,h) v(h,1) + e_c(m,1) \quad \text{Ecuación 11}$$

donde \mathbf{v} es el vector de coeficientes ($\mathbf{hx1}$), que relaciona los escalares (scores), con las concentraciones \mathbf{c} , de los analitos, en cada una de las disoluciones de mezclas patrón de la matriz de calibración y $\mathbf{T(m,h)}$ es la matriz de escalares (scores)

❖ Método PLS o mínimos cuadrados parciales

Este método se basa, al igual que PCR, en el análisis mediante PCA, pero se diferencia en que mientras que este último sólo utiliza la información contenida en la matriz de señales a cada canal, el algoritmo de PLS utiliza además la información contenida en la matriz de concentraciones, contribuyendo en mayor cuantía los espectros que corresponden a mayores concentraciones. Este método presenta la ventaja que permite calibrar, predecir y estudiar estadísticamente los residuos en forma separada para cada componente de una muestra, y es ideal para muestras en los que los componentes tienen intensidades espectrales muy diferentes.

A diferencia de PCR, en PLS existes dos clases de factores espectrales, unos que podíamos denominar factores espectrales o *loading sopesados*, que compondría una matriz \mathbf{W} , y otros llamados simplemente factores espectrales o *loading contenidos* en \mathbf{B} . Los elementos de \mathbf{W} dependen de las concentraciones de calibración del analito de interés. La matriz de *scores* se denomina \mathbf{T} .

Se podría demostrar que el coeficiente de regresión en PLS (\mathbf{b}_k) es función de \mathbf{W} , \mathbf{B} , \mathbf{T} y la concentración de interés \mathbf{c}_k

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

$$\begin{aligned} \mathbf{A} &= \mathbf{T}_A \cdot \mathbf{B}_A^T + \mathbf{E}_A \\ \mathbf{C} &= \mathbf{T}_C \cdot \mathbf{B}_C^T + \mathbf{E}_C \end{aligned} \qquad \text{Ecuación 12}$$

donde \mathbf{T}_A y \mathbf{T}_C son las matrices de los *scores* de la matriz de medida \mathbf{A} y de la matriz de concentraciones \mathbf{C} , respectivamente, \mathbf{B}_A y \mathbf{B}_C son las respectivas matrices de *loadings*, y \mathbf{E}_A y \mathbf{E}_C representan los errores de \mathbf{A} y de \mathbf{C} del modelo. En un modelo simplificado, los *scores* de cada matriz se calculan por separado y si las fuentes de variación de \mathbf{A} y de \mathbf{C} fuesen idénticas, también lo serían las correspondientes matrices de *scores*, pero en la mayoría de los casos se encuentra que los *scores* de ambas matrices están relacionados por la llamada relación interna (\mathbf{r}): $t_C = r t_A + e$.

Esto indica que los *scores* t_A no son los óptimos para estimar \mathbf{A} al haber sufrido cierta rotación para describir simultáneamente la matriz \mathbf{C} .

La descomposición y regresión se puede realizar de forma conjunta para todos los componentes, optimizándose lo que se podría considerar como un valor medio del número de factores, mediante la aplicación de la modalidad **PLS2**. Sin embargo, en el caso de que la optimización y descomposición se haga para cada componente individualmente el método se designa **PLS1**. Teniendo en cuenta la rapidez de cálculo actual mediante los ordenadores habituales, la aplicación de **PLS2** no tiene grandes ventajas frente a la aplicación de **PLS1**. Por otra parte, hay que tener en cuenta que cuando el número de factores optimizado para los distintos componentes es el mismo, ambos tratamientos son idénticos y arrojan los mismos resultados. **PLS2** se puede considerar como un algoritmo global cuya aplicación más interesante puede ser

el reconocimiento de modelos, mientras **PLS1** resulta más adecuado para análisis cuantitativo.

Los algoritmos correspondientes a los métodos PCR y PLS¹⁷⁻²⁷ pueden modificarse para conseguir que ambos métodos, que asumen un modelo lineal, puedan aplicarse al análisis multivariante no lineal²⁸.

- **Optimización del número de loading**

El número de loading 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 denominado parámetro **PRESS** (Prediction Residual Error Sum of Squares), suele estar recomendada en la bibliografía especializada.

¹⁷ Wold, S., Kettaneh-Wold, N., Skagerberg, B., *Chemometrics Intelligent Laboratory Systems*, 7, 53, 1989

¹⁸ Malinowski, E.R. y Howery D.G.; *Factor Analysis in Chemistry*; John Wiley and Sons. New York, 1980

¹⁹ Kowalski, B.R. y Seasholtz, M.B.; *Journal of Chemometrics*, 5, 129, 1991

²⁰ Geladi, P. y Kowalski, B.R.; *Analitica Chimica Acta*, 185, 1, 1986

²¹ Frank, I.; *Chemometrics Intelligent Laboratory Systems*, 8, 108, 1990

²² Wold, S.; *Chemometrics Intelligent Laboratory Systems*, 14, 57, 1992

²³ Tauler, R., Izquierdo-Ridora, A., y Casassas, E.; *Anales de Química*, 87, 571, 1991

²⁴ Walpole, R.E., y Myers, R.H.; *Probabilidad y Estadística para Ingenieros*, 3ª ed. Interamericana. México. 1990

²⁵ Barker, G.C. y Gardner, A.W.; *At. Energy Res. Establ. (GB). AERE Harwell C/R*, 2297 1958

²⁶ Barker, G.C. y Gardner, A.W.; *Z. Analytical Chemistry*, 173, 79, 1960

²⁷ Parry, E.P., y Osteryoung, R.A.; *Analytical Chemistry*, 36, 1366, 1964

²⁸ Naes, T., Isaksson, T., Kowalski, B. R., *Analytical Chemistry*, 62, 664, 1990

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

$$\text{PRESS} = \sum_{j=1}^n \sum_{i=1}^m (\hat{C} - C_i)^2 \quad \text{Ecuación 13}$$

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:

$$\text{SEP} = [\text{PRESS}/m]^{1/2} \quad \text{Ecuación 14}$$

Experimentalmente, el PRESS se obtiene mediante el siguiente procedimiento:

- ✓ De todos los patrones del set 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 set 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. Cuanto 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 vectores 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 propuesta por Haaland y Thomas²⁹, 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^* .

²⁹ Haaland, D.M., Thomas, E.V., *Analytical Chemistry*, 60, 1202, 1988

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 $F(h) < F_{\alpha, r, r}$, siendo $F_{\alpha, r, r}$ el $(1-\alpha)$ por ciento de la probabilidad F de Snedecor con m y m grados de libertad, siendo m el número de muestras del set de calibración.

Haaland y Thomas³⁰ 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, si 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^{29,31}. También factores de tipo instrumental, tales 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 loading 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 set de calibración (análisis cluster).

³⁰ Haaland, D.M., Thomas, E.V., *Analytical Chemistry*, 60, 1193, 1988

³¹ Sekulic, S., Seasholtz, M.B., Wang, Z., Kowalsky, B. R., Lee, S.E., Holt, B.R., *Analytical Chemistry*, 65, 835A, 1993

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 $x_i = \hat{x}_i + e_i$, donde x_i es el valor teórico; \hat{x}_i , el calculado, y e_i el error cometido en el cálculo, podemos expresar:

$$\sum_i (x_i - \bar{x})^2 = \sum_i (\hat{x}_i - \bar{x})^2 + \sum_i e_i^2 \quad \text{Ecuación 15}$$

siendo \bar{x} el valor medio de los valores teóricos.

Así pues, la suma de los cuadrados totales (SCT) es igual a la suma de los cuadrados de la regresión (SCR) más la suma de los cuadrados de los errores (SCE):

$$SCT = SCR + SCE \quad \text{Ecuación 16}$$

Teniendo en cuenta que:

$$SCE = \sum_i (x_i - \hat{x}_i)^2 \quad \text{Ecuación 17}$$

Se define el coeficiente de determinación o de correlación como:

$$R^2 = \frac{SCR}{SCT} = 1 - \frac{\sum_i (x_i - \hat{x}_i)^2}{\sum_i (x_i - \bar{x}_i)^2} \quad \text{Ecuación 18}$$

Un segundo parámetro estadístico también empleado, y que se denomina desviación estándar media residual, RMSD (*Residual mean standard deviation*) que es la raíz cuadrada de las desviaciones medias,

$$\text{RMSD} = \sqrt{\frac{\sum_i (x_i - \hat{x})^2}{n}}$$

Ecuación 19

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 y PCR son métodos diseñados para usar el espectro completo, sin embargo, nos podemos encontrar con circunstancias o técnicas instrumentales donde elegir la región del espectro esta 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. Hay técnicas, por ejemplo IR, donde amplias zonas del espectro pueden no estar aportando información espectral útil y como consecuencia se deben eliminar. 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 se eligen las regiones que tienen valores de R^2 igual o próximos a 1. En técnicas de absorción y fluorescencia molecular al ser bandas anchas poco estructuradas, se suele trabajar con el espectro total.

- **DetECCIÓN DE MUESTRAS DISCREPANTES O 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, y 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.

Otros métodos se basan en tratamientos matemáticos más complejos y conducen también a resultados válidos; por ejemplo, el análisis cluster o el análisis de residuos.

1. **ANÁLISIS CLUSTER:** Puede emplearse el valor de *score* para detectar una muestra errónea. Si todos los valores de *scores* para las muestras de una calibración, empleando factor 1, se representan frente a los valores de *scores* obtenidos para otro factor, los valores se deben encontrar agrupados alrededor de un valor medio (grupo \equiv cluster). De hecho, se puede medir la distancia estadística entre una muestra sospechosa y el valor medio obtenido para el cluster, que se conoce con el nombre de *distancia de Mahalanobis*, que asigna una probabilidad ponderada a la muestra en términos de desviación estándar. Cualquier muestra que se encuentre

a una distancia superior a ± 3 desviaciones estándar sobre el valor medio, se puede considerar sospechosa, siendo común un aumento en los valores para aquellas muestras que se encuentren en el extremo más alto ó más bajo del rango de concentraciones elegido para la calibración.

2. **ANÁLISIS DE RESIDUOS**: Los residuos constituyen otro camino para identificar muestras sospechosas. Cuando una muestra se predice, el dato es el mejor ajuste obtenido con una combinación lineal de vectores *loading*. Después de ajustar el espectro queda siempre una información residual. El valor de este residuo es un indicador de cómo parte de la información puede no haber sido modelada. Si el residuo para una determinada muestra es excepcionalmente elevado comparado con el resto, resulta sospechoso.

❖ **Comparación de los métodos multivariantes CLS, PCR y PLS**

Se pueden establecer las siguientes conclusiones en cuanto a los métodos multivariantes más comunes citados en esta Introducción.

1. CLS, PCR y PLS pueden utilizar la información espectral completa y presentan una elevada precisión. Sin embargo, ILS precisa de una selección previa de las longitudes de onda y necesita un gran número de muestras patrón.
2. CLS necesita toda la información referente a las muestras, causas de interferencias e incluso variables instrumentales. ILS, PCR y PLS no necesitan de un modelo químico explícito de la matriz de respuesta, y permiten la evaluación de las concentraciones de los componentes de interés aún en presencia de otras causas de variación no explicitadas en el modelo.

3. Así, PCR y PLS, son modelos que no sólo gozan de las ventajas de CLS al ser métodos de espectro completo, sino también de las de ILS en cuanto son capaces de desarrollar el análisis para un componente cada vez, evitando los problemas de la selección de un número limitado de longitudes de onda.
4. PLS y PCR son aplicables en algunos casos donde se producen interacciones de tipo químico entre los componentes analizados, son capaces de modelar comportamientos no estrictamente lineales.
5. PLS-1 utiliza factores espectrales e información de concentraciones referidas al componente de interés de forma individualizada, a diferencia de PCR.

- **La señal neta del analito en PLS**

Para dos compuestos 1 y 2, los espectros a concentración unitaria se llaman \mathbf{s}_1 y \mathbf{s}_2 (en absorción molecular comprenderían a $A/c=\epsilon b$; serían $\epsilon_1=f(\lambda)$ y $\epsilon_2=f(\lambda)$), luego representan la sensibilidad a cada sensor. Evidentemente \mathbf{s}_1 y \mathbf{s}_2 son dos vectores columnas. En general, se tratan de vectores columnas \mathbf{s}_k (para el componente k de los K componentes presentes en la muestra), de Jx1 elemento (siendo J los sensores). Si en una muestra están presentes los dos componentes en diferentes concentraciones, el espectro de dicha muestra vendrá dado por el vector $\mathbf{r}=\mathbf{C}_1\cdot\mathbf{S}_1+\mathbf{C}_2\mathbf{S}_2$ siendo \mathbf{C}_1 y \mathbf{C}_2 las concentraciones de los analitos 1 y 2, y \mathbf{r} la respuesta global para una calibración de I muestras denominada matriz \mathbf{R} , o matriz de respuesta.

En calibración inversa, como es el caso de PLS, se emplea, como ya hemos indicado, la ley de linealidad inversa $\mathbf{c}_k = \mathbf{R}^T \mathbf{b}_k$ donde se supone la existencia de una proporcionalidad entre la concentración de un componente k y las respuestas de las muestras de calibración contenidas en \mathbf{R} a través del vector de coeficientes de regresión \mathbf{b}_k .

La matriz original de datos puede escribirse de modo que las contribuciones del analito k se separen de los del resto de los analitos como $\mathbf{R} = \mathbf{R}_{\text{ANALITO } k} + \mathbf{R}_{\text{OTROS ANALITOS}}$

Esta separación se puede hacer más explícita mediante cálculo matricial según:

$$\mathbf{R} = \mathbf{R}_{-k} + \mathbf{R}_k = \mathbf{S}_{-k} \cdot \mathbf{C}_{-k}^T + \mathbf{S}_k \cdot \mathbf{C}_k^T \quad \text{Ecuación 20}$$

donde \mathbf{C}_{-k} es una matriz de $(k-1) \times J$ que contiene las concentraciones de todos los analitos excepto k , y \mathbf{S}_{-k} una matriz de $J \times (K-1)$ cuyas columnas son las sensibilidades de todos los analitos excepto k .

Significa que la matriz de proyección $(\mathbf{I} - \mathbf{R}_{-k} \cdot \mathbf{R}_{-k}^T)$ es capaz de proyectar el espectro \mathbf{r} de una muestra en un espacio ortogonal a todos los analitos excepto k , y se representa por \mathbf{r}_k^* , mientras que la matriz de proyección se simboliza por $\mathbf{P}_{\text{NAS},k}$ (**NAS por Net Analyte Signal**):

$$\mathbf{r}_k^* = (\mathbf{I} - \mathbf{R}_{-k} \cdot \mathbf{R}_{-k}^T) \cdot \mathbf{r} = \mathbf{P}_{\text{NAS},k} \cdot \mathbf{r} \quad \text{Ecuación 21}$$

igualmente se puede escribir:

$$\mathbf{s}_k^* = \mathbf{P}_{\text{NAS},k} \cdot \mathbf{s}_k \quad \text{Ecuación 22}$$

Se puede demostrar que los vectores r_k^* y S_k^* son paralelos y que la constante de proporcionalidad es la concentración c_k luego:

$$r_k^* = c_k S_k^* \quad \text{Ecuación 23}$$

en otras palabras, c_k es la pendiente de la recta ajustada por mínimos cuadrados entre r_k^* y S_k^* (NASRP). Dicha linealidad está relacionada con la ausencia de interferencias no modeladas. Gráficos del NASRP altamente lineales corresponden a muestras cuyos componentes están adecuadamente modelados por la matriz S.

Se puede realizar una medida cuantitativa de la linealidad del NASRP que permite cuantificar el efecto de la interferencia.

El denominado error indicador (E.I.) mide la desviación de la linealidad entre la señal neta del analito en la muestra y cuando este está puro, según la ecuación:

$$E.I. = \frac{S \left(1 + \frac{J^2 s^2}{4 \|r_k^*\|^2} \right)^{\frac{1}{2}}}{\|r_k^*\|} \quad \text{Ecuación 24}$$

donde S es la desviación estándar de la recta ideal en NASRP

$$S = \frac{\|e^*\|}{(J-k)^{\frac{1}{2}}} \quad \text{Ecuación 25}$$

Podremos, por tanto, seleccionar J para obtener el menor E.I., y en consecuencia, la mejor linealidad y la óptima eliminación de interferencias.

Cuando los valores experimentales se encuentran contenidos en el vector r^* , y los calculados en el vector S^* , se pueden definir los residuos como:

$$e = r_k^* - C_k \cdot s_k^* \quad \text{Ecuación 26}$$

La matriz R_{-k} puede obtenerse mediante cualquier procedimiento que permita descontar la contribución del analito k a los datos. Una posibilidad para el cálculo de R_{-k} es a través de la siguiente ecuación:

$$R_{-k} = R - \left(\frac{r}{C_k} \right) \cdot C_k^T \quad \text{Ecuación 27}$$

Donde r es el espectro de una muestra cualquiera que contiene al analito k en concentración C_k . En PLS esta matriz R_{-k} se reconstruye a partir de las matrices de los factores espectrales según:

$$R_{-k} = R \cdot T^T - [P(W^T P)^{-1} W^T \cdot r] \cdot [C_k^T (T^T)^T T^T] / [C_k^T (W^T P)^{-1} W^T r] \quad \text{Ecuación 28}$$

❖ **Los parámetros de calidad en análisis multivariante**

Los parámetros de calidad también denominados en la literatura como cifras ó Figuras de mérito se consideran fundamentalmente a: 1) los límites de detección y cuantificación, 2) la selectividad y 3) la sensibilidad.

En calibración multivariante, el límite de detección (LOD) se define normalmente como $3Sb/m$, siendo m la pendiente de la recta de calibrado (y donde el número 3 debería reemplazarse en realidad por el parámetro no centralizado de la distribución t para un 95% de confianza)

Como expresión del concepto anterior, en calibración multivariante podría formularse una expresión similar basada en los coeficientes de regresión para cada componente según:

$$LOD_k = 3 \cdot S_{bl} \cdot \|b_k\| \qquad \text{Ecuación 29}$$

o bien

$$LOQ_k = 10 \cdot S_{bl} \cdot \|b_k\| \qquad \text{Ecuación 30}$$

siendo S_{bl} igual a la desviación de la norma del blanco y $\|b_k\|$ la norma del coeficiente de regresión.

Sin embargo, estos parámetros son peligrosos en calibración multivariante, ya que si existen interferencias no modeladas, los límites de detección y cuantificación se vuelven función de las interferencias.

En análisis multivariante, el límite de detección de un componente va a verse influenciado por la presencia de los demás componentes y las concentraciones relativas.

La selectividad se puede definir en términos de:

$$SEL_k = \frac{1}{\|b_k\| \cdot \|S_k\|} \quad \text{Ecuación 31}$$

Por último, la sensibilidad, análoga a la calibración univariante, se define como:

$$SEN_k = \frac{1}{\|b_k\|} \quad \text{Ecuación 32}$$

Conviene también definir la sensibilidad analítica, como el cociente entre la sensibilidad y el nivel promedio del ruido (aproximado a la desviación del blanco)

$$\gamma_k = \frac{SEN_k}{S_{bl}} \quad \text{Ecuación 33}$$

este parámetro tiene unidades de inversa de concentración y su inversa, γ^{-1} , se define como la menor diferencia de concentración de un analito dado que puede apreciarse a lo largo del intervalo de calibración, y es útil para comparar métodos en forma independiente del tipo de señal utilizada para cuantificar.

2. Procedimiento de trabajo. Elección de las condiciones químicas y de los parámetros instrumentales.

En base a los estudios previos realizados, se fijaron las siguientes condiciones:

a) Medio micelar

Trabajaremos con disoluciones en las que fijaremos una concentración de agente tensoactivo de 12.0 mM, dado el aumento de fluorescencia observado para los analitos en presencia de SDS.

b) Acidez del medio

Inicialmente se proponen dos posibles valores de pH, un valor neutro en torno a 7.4, y un valor más ácido en torno a 4.0. Para determinar cual es el adecuado, se registraron los correspondientes espectros tridimensionales para cada uno de los analitos, y como consecuencia de este estudio llegamos a la conclusión de que a valores de pH 4.0 es donde existe menor grado de solapamiento, como se puede observar en la Figura III. 1 y Figura III. 2.

Observamos que la especie que presenta mayor grado de solapamiento es el norfloxacin. Existe una longitud de onda de excitación que puede ser utilizada para excitar simultáneamente a los tres fármacos, como solución de compromiso, que es $\lambda = 277$ nm. Los máximos de emisión se encuentran entorno a 400, 440 y 500 nm, respectivamente para el enoxacin, norfloxacin y ofloxacin.

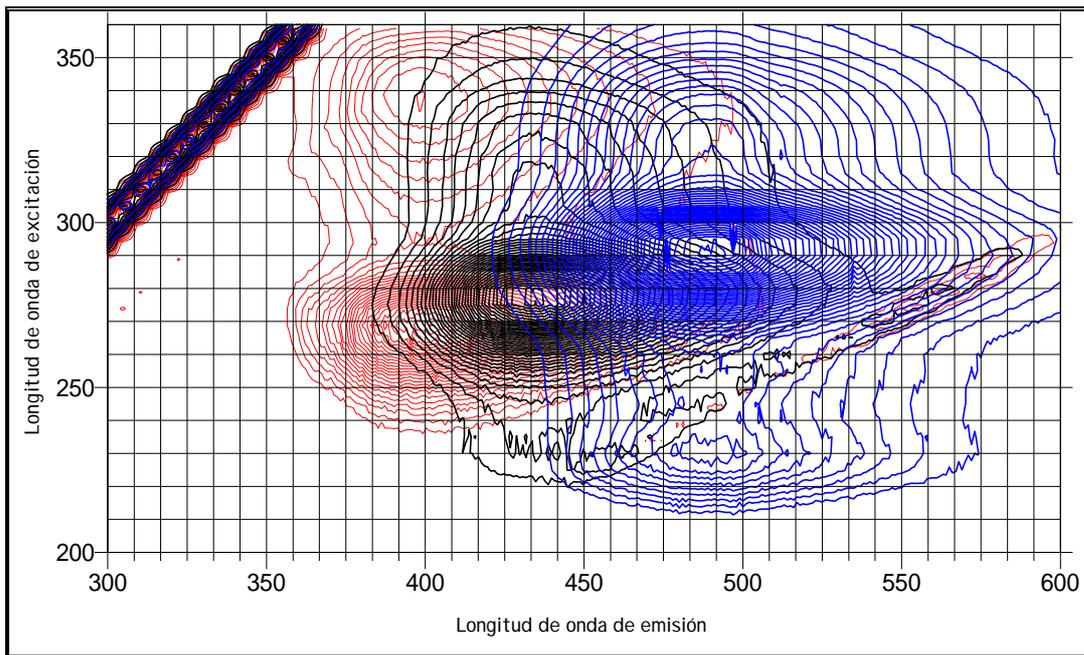


Figura III. 1.- Mapa de contorno de **enoxacino (1 µg/mL)**, **norfloxacino (0.1 µg/mL)**, **ofloxacino (0.1 µg/mL)**; pH 4.0

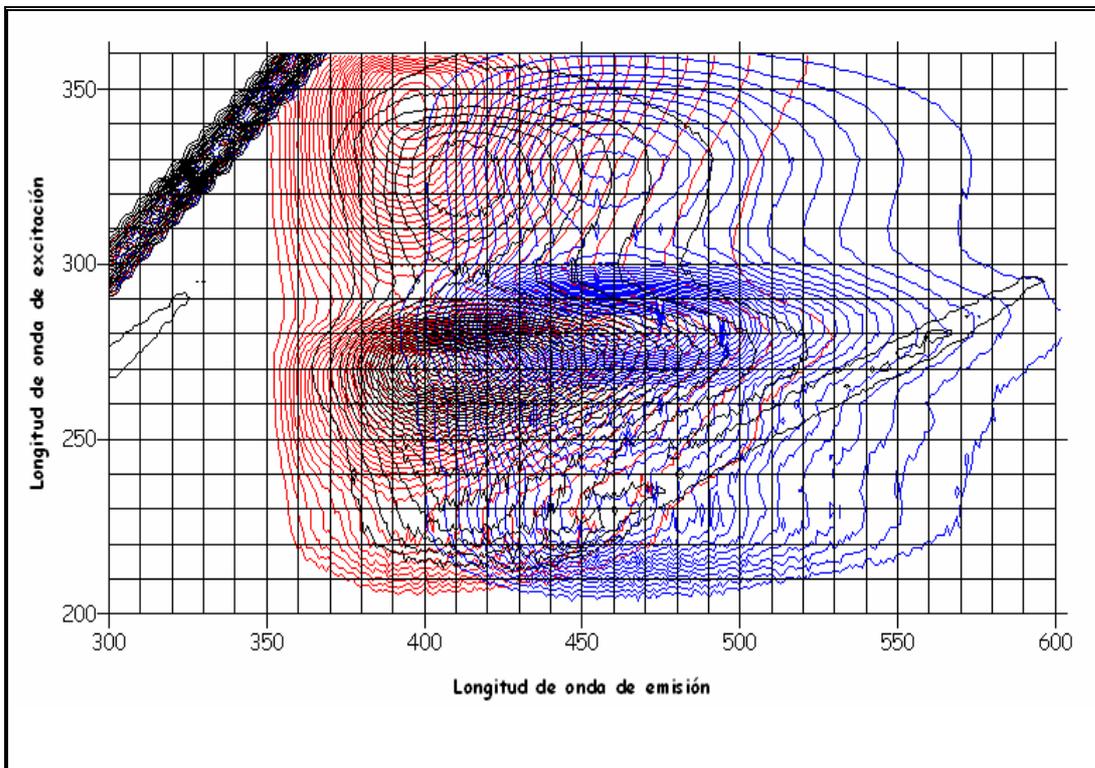


Figura III. 2.- Mapa de contorno de **enoxacino (1 µg/mL)**, **norfloxacino (0.1 µg/mL)**, **ofloxacino (0.1 µg/mL)**; pH 7.4

Aunque a pH 7.4 las señales aparecen más intensas, es a pH 4.0 donde el grado de solapamiento es menor, lo que nos proporciona una mejor resolución para la determinación de los tres principios. Establecemos un pH 4.0, fijado mediante tampón acético/acetato sódico, para los posteriores estudios.

c) *Condiciones instrumentales*

En vista de las Figuras anteriores, concluimos que la longitud de onda de excitación de compromiso que se debe utilizar es $\lambda_{exc} = 277$ nm. Fijaremos el potencial del detector en un valor de 800 V. Las rendijas de los monocromadores quedarán fijadas en 8 nm y 4 nm para excitación y emisión, respectivamente.

Estudio de la linealidad entre la intensidad de fluorescencia y la concentración de las fluoroquinolonas en estudio.

Antes de comenzar a realizar un estudio detallado del análisis simultáneo de los tres componentes, se analizó el comportamiento de cada uno de los analitos por separado, utilizando las condiciones fijadas anteriormente. Es decir, se trabajará con disoluciones acuosas, en las que fijaremos en primer lugar una concentración de SDS de 12.0 mM y posteriormente la acidez del medio, mediante la adición del volumen adecuado de tampón acético acetato, de forma que la concentración final del mismo sea de 0.02 M. La longitud de onda de excitación será de 277 nm y el potencial del detector quedará fijado en 800 V.

a) Norfloxacin

Se estableció en primer lugar que concentración máxima podía ser medida sin causar la saturación del detector. Para ello empezamos con una concentración de 50 ng/mL y se hizo disminuir hasta llegar a un valor de concentración que pudiese ser medido. Este límite superior quedó fijado en 25 ng/mL.

Para construir la curva de calibración, se establecieron cinco puntos, el menor de ellos correspondiente a una concentración de 1.0 ng/mL y el mayor, como se ha indicado, de 25 ng/mL. Las muestras se prepararon por triplicado.

En la Figura III. 3 está representada la curva de calibración obtenida.

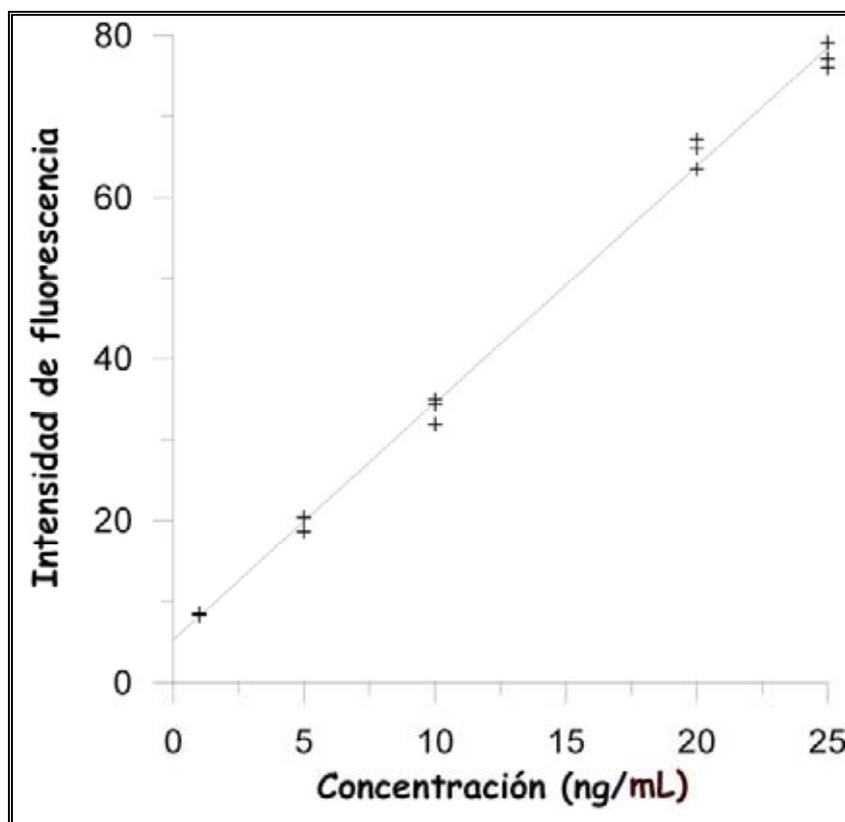


Figura III. 3.- Curva de calibración para el norfloxacin.

b) Enoxacino

Utilizando las mismas condiciones que las utilizadas para el analito anterior, se determinó en primer lugar la concentración máxima que puede ser objeto de estudio con las condiciones fijadas. Esta concentración resultó ser de 600 ng/mL.

Nuevamente se construyó la curva de calibración a partir de cinco puntos experimentales de concentración en el rango de 10 a 600 ng/mL. Cada punto se realizó por triplicado, al igual que en el caso anterior. Figura III. 4.

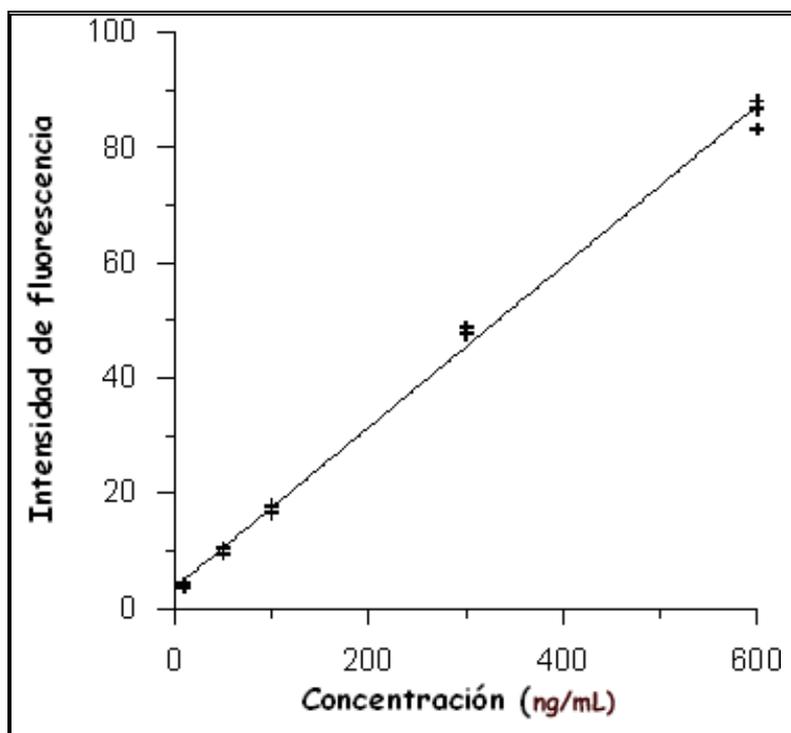


Figura III. 4.- Curva de calibración para el enoxacino

c) Ofloxacino

Realizamos un estudio similar a los anteriores. En primer lugar se determinó la concentración máxima de ofloxacino que puede ser determinada bajo las condiciones establecidas, que resultó ser 120 ng/mL. Nuevamente construimos la correspondiente curva de calibración, a partir de cinco puntos experimentales, realizados por triplicado. Aplicando la herramienta matemática de ajuste lineal mediante mínimos cuadrados, obtuvimos la siguiente recta. Figura III. 5.

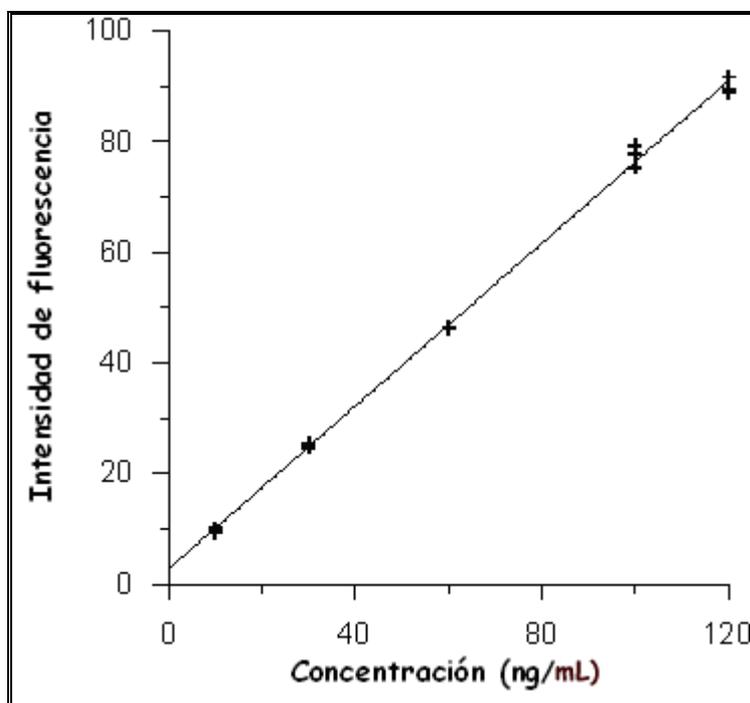


Figura III. 5.- Curva de calibración para el ofloxacino

Tabla III. 1, se recogen los parámetros estadísticos correspondientes a las curvas de calibración mostradas anteriormente, así como los correspondientes parámetros de calidad para cada uno de los analitos.

Tabla III. 1.- Parámetros de las curvas de calibración y parámetros analíticos de calidad.

	Norfloxacin	Enoxacin	Ofloxacin
Ordenada Origen	5.24 ± 0.70	3.45±0.02	2.74 ± 0.63
Pendiente (mL/ng)	2.93 ± 0.05	0.14±0.07	0.73 ± 0.01
Coef. Regresión	0.998	0.998	0.999
S(R,c)	1.61	1.86	1.32
Linealidad	98 %	98 %	99%
Límite detección Clayton (ng/mL)	1.4	31.5	4.9
Límite detección Winefordner y Long (k=3) (ng/mL)	0.7	14.4	2.7
Sensibilidad (ng/mL)	0.55	13.2	1.79

Finalmente se estudió la aditividad de las señales en las condiciones propuestas, comprobándose la aditividad de las mismas.

Matriz de calibración

Utilizaremos un método de diseño denominado *diseño central compuesto*. Este diseño es un paso fundamental 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, a la vez, abarcar un amplio rango de concentraciones, que incluyan las relaciones entre las concentraciones de los componentes en las muestras de interés.

En la Figura III.6 podemos ver como se distribuyen los patrones de la matriz de calibración. Cada uno de estos patrones se preparó en matraces de 10 mL a partir de disoluciones concentradas de los analitos en etanol. Dada la imposibilidad de prepararlas directamente a partir de las disoluciones madre, fue necesario realizar una disolución de concentración intermedia. Se comprobó que al fijar el medio micelar en estas disoluciones intermedias se ganaba en sensibilidad y además se perdía ruido espectral. De este modo, al preparar estas disoluciones intermedias se fijó una concentración de SDS de 12.0 mM. A partir de éstas, se prepararon los patrones, a los cuales se les adicionó el volumen necesario de disolución de SDS hasta completar una concentración de 12.0 mM y 0.4 mL de disolución tampón acético acetato 0.5 M de pH= 4.0. Previo a realizar la medida, es necesario agitar vigorosamente el matraz para conseguir una perfecta homogeneización.

Al aplicar este diseño, el número de patrones que son necesarios para la construcción de la matriz, es de 15.

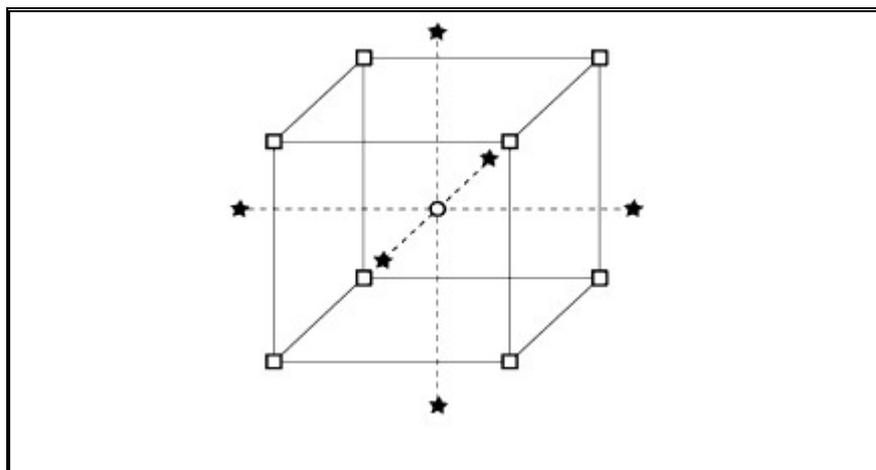


Figura III. 6.- Representación tridimensional de la matriz de calibración.

Las concentraciones de cada componente se recogen en Tabla III. 2.

Tabla III. 2.- Composición de la matriz de calibración.

Muestra	Norfloxacin (ng/mL)	Ofloxacin (ng/mL)	Enoxacin (ng/mL)
Mt1	5,28	63,4	16,9
Mt2	5,28	63,4	63,1
Mt3	5,28	237	16,9
Mt4	5,28	237	63,1
Mt5	19,7	63,4	16,9
Mt6	19,7	63,4	63,1
Mt7	19,7	237	16,9
Mt8	19,7	237	63,1
Mt9	0	150	40
Mt10	25	150	40
Mt11	12,5	0	40
Mt12	12,5	300	40
Mt13	12,5	150	0
Mt14	12,5	150	80
Mt15	12,5	150	40

Para cada una de estos patrones registramos su correspondiente espectro de emisión, según las condiciones establecidas. En la Figura III. 7 podemos observar la totalidad de espectros utilizados.

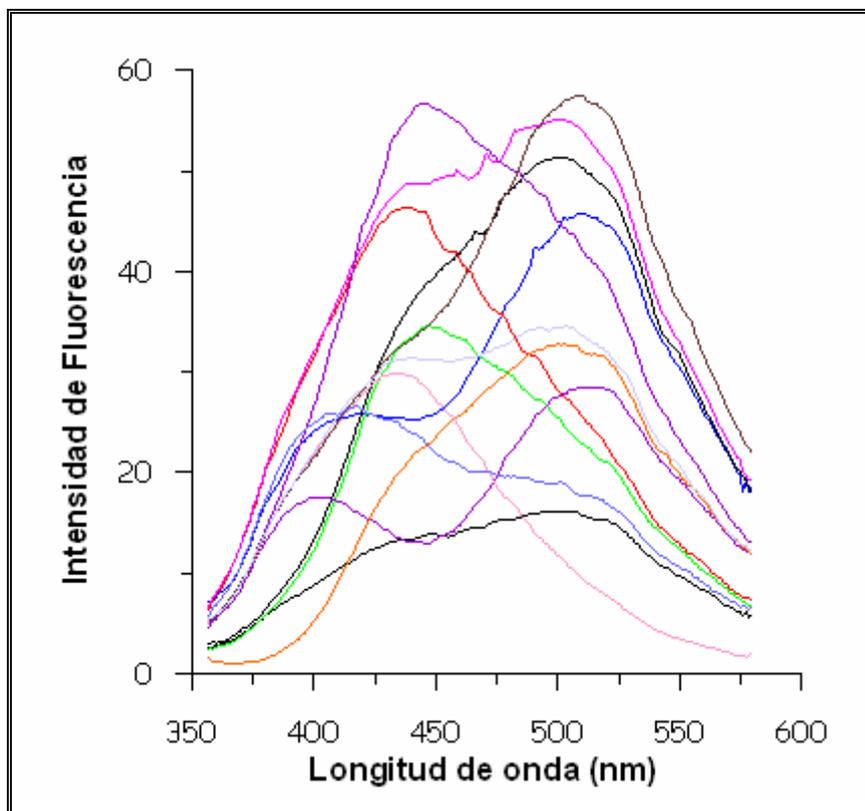


Figura III. 7.- Espectros de emisión correspondientes a las muestras que componen la matriz de calibración ($\lambda_{ex}=277$ nm)

Para calcular la matriz de calibración, se hizo uso del paquete informático *MULTIVAR 7*³².

³² Olivieri, A.C., *Calibración Multivariada. Introducción a la Programación con MATLAB*, Ediciones Científicas Argentina. Buenos Aires. 2001

Multivar7, es un programa que nos permite llevar a cabo calibración multivariante, mediante diversos algoritmos tales como PCR, PLS y otros basados en la señal neta del analito, como HLA/GO. El programa ha sido diseñado mediante Visual Basic 5.0. 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, los parámetros indicadores de error y residuales basados en el NAS. También nos permite obtener la señal neta para el analito, residuos espectrales, factores espectrales, coeficientes de regresión final y scores.

El programa MULTIVAR puede trabajar en entorno Windows. Tiene una presentación muy sencilla, que permite su fácil utilización. Requiere que los espectros del set de calibración sean registrados en formato ASCII.

A modo de ejemplo, se muestra la pantalla principal del programa (Figura III. 8):

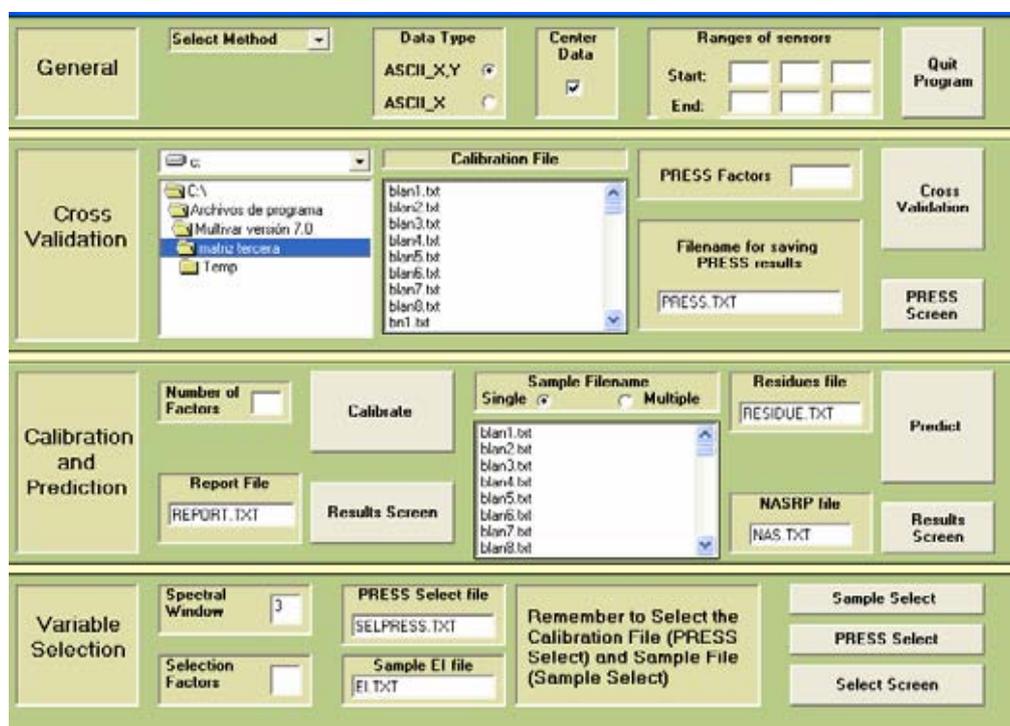


Figura III. 8.- Pantalla principal del programa Multivar Versión 7.0

La zona de análisis espectral fue diferente para cada uno de los analitos. Para determinar que región del espectro nos proporcionaba mejores resultados, para cada uno de los principios activos, se hizo la calibración cruzada modificando el rango de los sensores (longitudes de onda). 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 espectral. Hemos seleccionado como óptimo el número de factores para el primer valor del PRESS, cuya probabilidad para la razón F es menor que 0.75, de acuerdo con el criterio de Haaland y Thomas²⁹. En la Tabla III. 3 se recogen los valores obtenidos para el PRESS y el coeficiente de correlación mediante PLS.

Tabla III. 3.-Parámetros estadísticos del modelo PLS en la zona espectral óptima para cada componente.

	PLS-1			
	Rango λ (nm)	Factores	PRESS	Coficiente de determinación(R^2)
Enoxacino	360-430	2	333	0.9689
Norfloxacino	390-440	5	10.4	0.9858
Ofloxacino	460-540	3	13.8	0.9982

Como se puede observar, el número de factores óptimos es menor para el enoxacino, que corresponde con el analito que presenta menor grado de solapamiento, seguido por el ofloxacino y norfloxacino. Siendo para el norfloxacino el mayor número, ya que es el analito que aparece en la posición central del espectro, y por tanto con mayor grado de solapamiento.

En la Figura III. 9, se ha representado la concentración actual frente a la concentración predicha para cada uno de los analitos, así como el error típico para cada medida.

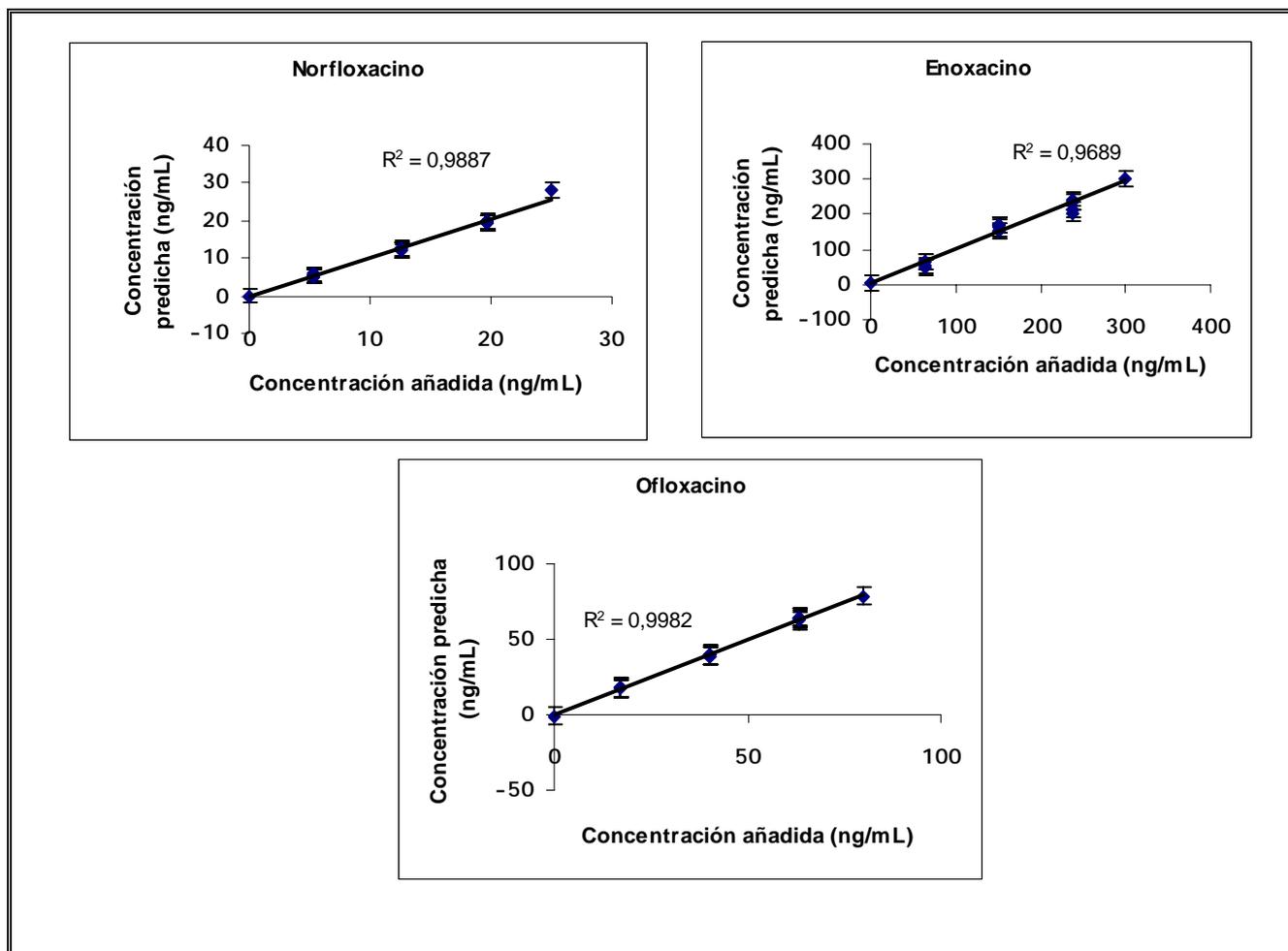


Figura III. 9. Relación entre la concentración añadida y predicha. Representación del error típico para cada medida.

3. Determinación simultánea de norfloxacin, enoxacin y ofloxacin en muestras de problemas sintéticos.

La matriz optimizada mediante PLS1 ha sido aplicada a la determinación del componente individual y a muestras ternarias y binarias como grupo de predicción. Todas las concentraciones que aparecen en las siguientes tablas, están expresadas en ng/mL.

En la siguiente tabla, se encuentran las composiciones de cada una de estas muestras. Cada una de las muestras fueron preparadas por triplicado, siguiendo el mismo procedimiento que el establecido para preparar los patrones de la matriz de calibración.

Tabla III. 4. Aplicación del modelo PLS optimizado a la determinación de enoxacin, ofloxacin y norfloxacin en muestras individuales.

	Norfloxacin		
	C _T	C _C (RSD)	% R
Muestra 1	20	20.4 (2.0)	102
Muestra 2	16	17.3 (2.0)	108
Muestra 3	6	5.93 (4.0)	98.9

	Enoxacin		
	C _T	C _C (RSD)	% R
Muestra 4	200	222 (1.0)	111
Muestra 5	150	157 (4.0)	105
Muestra 6	70	83.3 (3.0)	119

	Ofloxacin		
	C _T	C _C (RSD)	% R
Muestra 7	60	57.7 (0.8)	96.0
Muestra 8	40	40.6 (1.0)	101
Muestra 9	200	21.9 (2.0)	109

Tabla III. 5. Aplicación del modelo PLS optimizado a la resolución de mezclas binarias de enoxacino, ofloxacino y norfloxacino.

	Enoxacino			Norfloxacino			Ofloxacino		
	C _T	C _C (RSD)	% R	C _T	C _C (RSD)	% R	C _T	C _C (RSD)	% R
Muestra 1	0	-----	----	6.0	6.2 (4.0)	104	80.0	74.4 (2.0)	93.0
Muestra 2	300	327 (4.0)	109	6.0	5.7 (3.0)	94.3	0	----	----
Muestra 3	70	83.4 (2.0)	119	20.0	20.5 (1.0)	102	0	----	----
Muestra 4	0	---	----	20.0	19.7 (2.0)	98.7	20	22.9 (2.0)	115
Muestra 5	70	85.7 (3.0)	122	0	----	-----	80	74.4 (2.0)	93.0

Tabla III. 6. Aplicación del modelo PLS optimizado a la resolución de mezclas ternarias de enoxacino, ofloxacino y norfloxacino.

	Enoxacino			Norfloxacino			Ofloxacino		
	C _T	C _C (RSD)	% R	C _T	C _C (RSD)	% R	C _T	C _C (RSD)	% R
Muestra 1	300	271 (3.0)	90.3	6	6.76 (2.3)	113	20	18.0 (2.0)	90.0
Muestra 2	250	236 (2.0)	94.4	10	9.65 (5.0)	96.5	40	39.1 (2.0)	97.8
Muestra 3	200	191 (4.0)	95.2	12	11.2 (3.0)	93.3	60	56.2 (0.9)	93.6
Muestra 4	150	141 (3.0)	93.8	20	18.7 (0.5)	93.5	80	75.6 (1.0)	94.5
Muestra 5	70	67.2 (4.0)	96.0	24	22.2 (1.0)	92.4	50	47.4 (0.4)	94

Se han utilizado grupos de predicción compuestos por muestras ternarias, manteniendo a uno de los componentes a una concentración constante y baja, modificando la concentración de los otros dos en todo el intervalo de concentraciones de la matriz. Los resultados de esta experiencia se recogen en la Tabla III. 7.

Tabla III. 7. Aplicación del modelo PLS optimizado a la resolución de mezclas ternarias, manteniendo la concentración de enoxacin constante, en un valor de 70.0 ng/mL, y concentraciones variables de ofloxacin y norfloxacin.

	Enoxacin			Norfloxacin			Ofloxacin		
	C _T	C _C	% R	C _T	C _C	% R	C _T	C _C	% R
Muestra 1	70.0	81.5	116	5.28	6.33	120	16.9	16.7	98.8
Muestra 2	70.0	80.5	115	5.28	6.08	115	63.1	63.0	99.8
Muestra 3	70.0	64.0	91.4	19.7	21.4	109	16.9	17.3	102
Muestra 4	70.0	62.4	89.1	19.7	21.2	108	63.1	63.8	101
Muestra 5	70.0	81.8	117	0	-	-	40.0	40.1	100
Muestra 6	70.0	55.0	78.6	25.0	25.1	100	40.0	40.6	101
Muestra 7	70.0	75.3	108	12.5	13.5	108	0	-	-
Muestra 8	70.0	66.7	95.3	12.5	12.8	102	80.0	78.5	98.1
Muestra 9	70.0	77.8	111	12.5	13.3	106	40.0	40.0	100

Tabla III. 8. Aplicación del modelo PLS optimizado a la resolución de mezclas ternarias, manteniendo la concentración de norfloxacin constante, en un valor de 6.0 ng/mL, y concentraciones variables de enoxacin y ofloxacin.

	Enoxacin			Norfloxacin			Ofloxacin		
	C _T	C _C	% R	C _T	C _C	% R	C _T	C _C	% R
Muestra 1	63.4	80.6	127	6.0	7.59	127	16.9	17.9	106
Muestra 2	63.4	76.8	121	6.0	7.63	127	63.1	66.2	105
Muestra 3	237	238	100	6.0	6.27	104	16.9	17.6	104
Muestra 4	237	241	102	6.0	7.43	124	63.1	66.6	105
Muestra 5	63.4	73.0	115	6.0	6.57	109	16.9	18.0	105
Muestra 6	150	149	99.3	6.0	6.63	110	40.0	41.9	105
Muestra 7	0	-	-	6.0	6.66	111	40.0	43.3	108
Muestra 8	300	348	116	6.0	6.89	115	40.0	41.3	103
Muestra 9	150	180	120	6.0	6.62	110	0	-	-
Muestra 10	150	178	119	6.0	6.67	112	80.0	82.4	103

Tabla III. 9. Aplicación del modelo PLS optimizado a la resolución de mezclas ternarias, manteniendo la concentración de ofloxacin constante, en un valor de 20.0 ng/mL, y concentraciones variables de enoxacin y norfloxacin.

	Enoxacin			Norfloxacin			Ofloxacin		
	C _{teorica}	C _{predicha}	R(%)	C _{teorica}	C _{predicha}	R(%)	C _{teorica}	C _{predicha}	R(%)
Muestra 1	63.4	78.8	124	5.28	6.00	114	20.0	21.3	106
Muestra 2	237	264	111	5.28	6.12	116	20.0	20.0	100
Muestra 3	63.4	63.6	100	19.7	20.8	105	20.0	20.4	102
Muestra 4	237	256	108	19.7	21.3	108	20.0	18.9	94.5
Muestra 5	150	149	99.3	0	-	-	20.0	20.5	102
Muestra 6	150	166	111	25.0	25.9	104	20.0	19.7	98.5
Muestra 7	0	-	-	12.5	12.8	102	20.0	19.8	99.0
Muestra 8	300	356	119	12.5	12.0	96.0	20.0	19.9	99.5
Muestra 9	150	183	122	12.5	13.2	106	20.0	20.6	103

Como conclusión de estas pruebas preliminares observamos que es para el caso del enoxacin, para el cual se obtienen peores resultados, ya que el valor medio de las recuperaciones se sitúa alrededor de un 110%. Para el caso del ofloxacin son los resultados más favorables, ya que en la mayoría de los casos los valores de recuperación son muy próximos al 100 %.

Si analizamos de forma individual cada uno de los resultados anteriores podemos concluir que, independientemente de la concentración que presente tanto el enoxacin como el ofloxacin, cuando el norfloxacin se encuentra a muy baja concentración, (< 10.0 ng/mL), los valores de recuperación son superiores al 110 %. Para valores de concentración de norfloxacin superiores a 10.0 ng/mL los valores de recuperación están entre un 96-108 % de recuperación.

Para el caso del enoxacin no existe ninguna pauta de comportamiento en cuanto a su propio valor de concentración. Parece deducirse que cuanto más concentrado está el norfloxacin, los valores de recuperación de enoxacin son más próximos al 100%. La influencia que ejerce el ofloxacin al enoxacin es nula.

En cuanto al ofloxacin no parece verse influenciado por el norfloxacin, presente ya que prácticamente para todas las muestras se obtienen valores adecuados y próximos de recuperación.

Repetitividad.

Se calcula la repetitividad (n=10) para muestras conteniendo 100 ng/mL de enoxacino, 20.0 ng/mL de norfloxacino y 50.0 ng/mL de ofloxacino. Los valores de RDS obtenidos son de 5.9%, 4.5% y 2.2% respectivamente. En la tabla 10 se detallan estos resultados.

Tabla III. 10. Concentraciones predichas para un grupo de 10 muestras, realizado en una misma jornada.

	Valores Calculados		
	Enoxacino (ng/mL)	Norfloxacino (ng/mL)	Ofloxacino (ng/mL)
Muestra 1	88.2	20.6	53.6
Muestra 2	81.3	19.1	51.2
Muestra 3	90.3	22.0	52.5
Muestra 4	84.4	20.6	55.3
Muestra 5	99.2	22.6	55.3
Muestra 6	86.9	21.4	54.5
Muestra 7	92.1	21.1	54.2
Muestra 8	93.7	21.3	53.7
Muestra 9	83.7	21.3	53.8
Muestra 10	87.4	20.5	52.9
Valor Medio. (Valor teórico)	88.7 (100.0)	21.0 (20.0)	53.8 (50.0)
RSD (%)	5.9	4.5	2.2
S_i^2	28.09	0.896	1.59

También se estudió la repetitividad de las medidas cuando se hace en días diferentes utilizando la matriz inicial, para ello se prepararon diariamente durante varios días una mezcla ternaria, de concentraciones de 70.0, 10.0 y 40.0 ng/mL de enoxacin, norfloxacin y ofloxacin, respectivamente. Se registraron los correspondientes espectros durante 8 jornadas utilizando siempre como matriz de calibración la obtenida inicialmente. Se obtuvieron los siguientes valores de recuperaciones media 68.0 ng/mL para el enoxacin, con un valor de RDS de 7.1 %, 11.05 ng/mL para el norfloxacin con un RDS de 4.7% y finalmente 41.9 ng/mL para el ofloxacin con RDS 7.5%. En la Tabla III. 11 se detallan los resultados obtenidos:

Tabla III. 11. Concentraciones predichas para un conjunto de 8 muestras realizadas en 8 jornadas diferentes.

	Valores Calculados		
	Enoxacin (ng/mL)	Norfloxacin (ng/mL)	Ofloxacin (ng/mL)
Día 1	66.1	11.1	46.9
Día 2	71.2	11.4	44.9
Día 3	64.3	12.0	42.9
Día 4	64.2	11.0	42.9
Día 5	74.1	10.3	39.6
Día 6	62.5	11.2	42.1
Día 7	66.4	10.7	38.2
Día 8	75.3	10.7	38.1
Valor Medio (Valor teórico)	68.0 (70.0)	11.05 (10.0)	41.9 (40.0)
RSD (%)	7.1	4.7	7.5
s_1^2	23.6	0.266	9.92

Se realizó una estudio estadístico, para determinar la existencia de diferencias significativas entre los dos conjuntos de datos. Para ello se realizó una comparación de las varianzas s_1^2 y s_2^2 de los dos conjuntos de datos mediante el test F de Fisher³³.

Para ello se calcula la relación:

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} \qquad \text{Ecuación 34}$$

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

En la Tabla III. 12 se indica el resultado de este test.

Tabla III. 12. Test de Fisher para la comparación de varianzas

	Enoxacino	Norfloxacino	Ofloxacino
F_{cal}	1.19	3.37	6.24
$F_{tab}(0.05, n_1-1, n_2-1)$	3.68	3.68	3.29

³³ Valcárcel, M.; Ríos, A.; *La calidad en los laboratorios analíticos*. Ed. Reverté, S.A. 1992. España.

De acuerdo con el test de Fisher no existen diferencias significativas entre los resultados de la repetitividad para los analitos norfloxacin y enoxacin; sin embargo, si existen diferencias estadísticamente significativas para el caso del ofloxacin. Este hecho podemos atribuirlo a que la dispersión de los resultados en un mismo día para el ofloxacin es considerablemente mejor que para los obtenidos en diferentes días. Para el caso de enoxacin y ofloxacin, en ambas experiencias el grado de dispersión es similar. Los valores de los errores son aceptables en todos los casos. Se puede concluir que la matriz de calibración se puede utilizar al menos durante nueve días desde su medida inicial con suficiente exactitud y precisión para determinar enoxacin y norfloxacin, siendo más conveniente efectuar las medidas el mismo día que se realiza la matriz de calibración, en el caso del ofloxacin.

Cálculo de los parámetros de calidad

Los parámetros de calidad obtenidos tras aplicar el método PLS, para el set de calibración, han sido calculados mediante la aplicación del software MULTIVAR7; de este modo se hallaron los parámetros de sensibilidad y selectividad. En cuanto a los valores de límites de detección se calculó en dos grupos de muestras diferentes:

- A) El primero consiste en registrar los espectros de un número de muestras de blanco, siguiendo las mismas condiciones que las establecidas para la construcción de la matriz de calibración. Este procedimiento para la determinación del límite de detección esta basado en la utilización del NAS. Una vez obtenidos los espectros de las muestras blanco y mediante un programa de cálculo en Qbasic, se estimó el valor de $\|S_{bl}\|$ según se ha explicado en la introducción del presente capítulo, dicho valor se aproxima al valor del ruido instrumental, $\|\varepsilon\|$. El LOD se puede calcular como:

$$\text{LOD} = 3\|\varepsilon\| \|b\| = \frac{3\|\varepsilon\|}{\text{SEN}} \quad \text{Ecuación 35}$$

siendo SEN la sensibilidad calculada por el modelo.

B) El segundo procedimiento consistió en aplicar el mismo criterio estadístico pero manteniendo constante la concentración del analito de interés, y modificando las otras según el intervalo de concentraciones de la matriz. La concentración que se mantiene constante es el valor más bajo, o un valor próximo, utilizado en la matriz de calibrado. Nuevamente se determina la desviación de la norma a través del NAS mediante un programa de cálculo en Qbasic³⁴.

En la Tabla III.13 Se han resumido los valores obtenidos para SEL, SEN, LOD por ambos métodos y para la sensibilidad analítica.

Tabla III. 13. Sensibilidad, Selectividad y Límites de detección

		Componente		
		Enoxacino	Norfloxacino	Ofloxacino
SEL		0.685	0.185	0.347
SEN		0.593	2.04	2.01
LOD (ng/mL)	A	8.0	0.3	0.8
	B	30.1	1.8	2.1
γ (mL/ng)		0.374	9.231	3.812
γ^{-1} (ng/mL)		2.67	0.11	0.26

Como se puede observar, la mayor sensibilidad corresponde al norfloxacino, con un límite de detección de 0.3 y 1.8 ng/mL, según los procedimientos A y B, muy adecuados para la determinación de este componente en fluidos biológicos.

Enoxacino es el derivado que presenta una menor sensibilidad analítica, aún así, presenta un límite de detección de 8.0 y 30.1 ng/mL, de acuerdo a los procedimientos A y B.

³⁴ Muñoz de la Peña, A. Programa elaborado en el Dpto. Química Analítica. U. Extremadura.

4 Determinación simultánea de derivados fluoroquinolónicos en fluidos biológicos

Se pretende la aplicación del modelo de cálculo PLS optimizado a la determinación simultánea, de los derivados fluoroquinolónicos en estudio, en muestras de orina.

En primer lugar, se estudió el grado de dilución al que podríamos someter a la orina, de forma tal que la señal del fondo fuese mínima; y siempre estableciendo como condición que las concentraciones finales de los analitos quedasen comprendidas en los rangos de la matriz de calibración, teniendo en cuenta las concentraciones biológicas.

Se establece una dilución inicial de la orina de 1:1000, y a partir de esta otras de 2:10; 1.5:10; 1:10; 0.5:10 y 0.1:10 mL respectivamente.

Los espectros de emisión de la orina a estas diluciones los podemos observar en la Figura III. 10.

Tras este estudio, fijamos como dilución óptima la de 0.1 mL en 100 mL, (1:1000), seguida de una segunda dilución de 1.5 mL en 10 mL. Se prepararon muestras de orina fortificadas con los tres analitos procediendo de la siguiente manera:

1. Tomar 0.1 mL de orina en matraz de 100 mL
2. Contaminar la orina con los analitos de interés
3. Dejar transcurrir 30 minutos para favorecer las posibles interacciones entre los analitos y la matriz de la orina.
4. Enrasar con agua suprapura a 100 mL
5. Tomar 1.5 mL y llevarlos a matraz de 10 mL
6. Fijar la concentración de SDS (12.0 mM) y el pH en 4.0 mediante la adición de 0.4 mL de disolución reguladora acético-acetato
7. Registrar el espectro de emisión a 277 nm, con un potencial de 800 V.

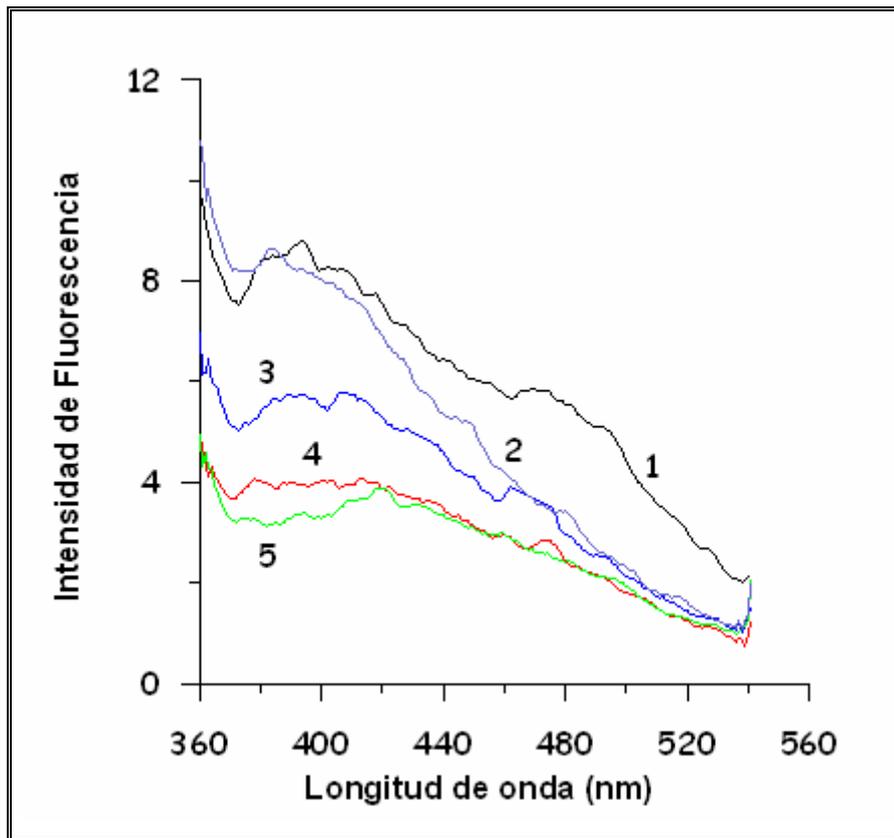


Figura III. 10. Espectro de las diferentes diluciones efectuadas a la orina (1) 2:10; (2) 1.5:10; (3) 1:10; (4) 0.5:10; (5) 0.1:10 mL respectivamente.

A continuación se procede a predecir dichas muestras mediante el modelo PLS optimizado.

En primer lugar, se preparó un conjunto de muestras problemas, para su predicción, empleándose para ello la matriz de calibración optimizada anteriormente. Los resultados de la predicción aparecen en la Tabla III. 14.

Tabla III. 14. Concentraciones predichas en tres muestras de orina.

	Norfloxacino			Enoxacino			Ofloxacino		
	Ca	Cp (RSD)	R (%)	Ca	Cp (RSD)	R (%)	Ca	Cp (RSD)	R (%)
Muestra 1	15	20.3 (1.5)	135	105	145 (8.8)	138	45	48.3 (1.3)	107
Muestra 2	19.5	26.7 (1.7)	137	79.5	87.6 (8.8)	110	75	81 (0.81)	108
Muestra 3	10.5	13.7 (3.4)	131	150	180 (5.4)	120	30	30.3 (2.3)	101

En función de los resultados anteriores, observamos que únicamente obtenemos valores adecuados para el ofloxacino, mientras que tanto para el norfloxacino como enoxacino, el modelo no puede realizar una predicción adecuada.

Se determinó recalcular la matriz de calibración, introduciendo en los patrones de calibración orina, así como una serie de blancos, con el objetivo de modelar la señal adecuadamente.

Tabla III. 15. Parámetros estadísticos del modelo PLS en presencia de orina en la zona espectral óptima para cada componente.

	PLS-1			
	Rango (λ, nm)	Factores	PRESS	Coefficiente de determinación(R ²)
Enoxacino	360-430	3	4350	0.9847
Norfloxacino	390-460	3	2.79	0.9981
Ofloxacino	460-540	4	14.7	0.9989

Como se puede observar, los parámetros estadísticos obtenidos en muestras que contienen orina son adecuados.

Al predecir las mismas muestras que en el caso anterior, se concluye que introduciendo en los patrones de calibración la misma proporción de orina que en las muestras reales, así como una serie de blancos, los resultados obtenidos son más satisfactorios.

Como se ha indicado anteriormente, en la matriz de calibración se han introducido los espectros correspondientes a 6 disoluciones blanco, siendo la orina de estas disoluciones procedente de una misma persona. Se planteó introducir en el set de calibración, además de las seis disoluciones anteriores, diez nuevas disoluciones blanco, procedentes de diez personas diferentes. Se reconstruyó la matriz de calibración utilizando 16 disoluciones blancos. Los parámetros estadísticos del modelo PLS se recogen en la Tabla III. 16, y como se puede observar se obtienen en todos los casos valores de coeficientes de correlación muy satisfactorios.

Tabla III. 16. Parámetros estadísticos del modelo PLS en la zona espectral óptima

	PLS-1			
	Rango λ (nm)	Factores	PRESS	Coefficiente de determinación(R^2)
Enoxacino	360-430	6	3230	0.9884
Norfloxacin	390-450	6	2.32	0.9988
Ofloxacin	460-540	3	19.9	0.9990

Los parámetros de calidad obtenidos en el análisis de muestras de orina aparecen resumidos en la Tabla III. 17

Tabla III.17. Sensibilidad, Selectividad y Límites de detección

		Componente		
		Enoxacino	Norfloxacin	Ofloxacin
SEL		0.532	0.174	0.338
SEN		0.401	1.893	2.001
LOD (ng/mL)	A	10.0	0.5	0.8
	B	33.0	2.1	2.0
γ^{-1} (ng/mL)		3.3	0.2	0.3

Se tomaron muestras de orina de nueve personas diferentes, de edades comprendidas entre 24-27 años. Cada una de las muestras fue contaminada de forma apropiada con tres niveles de concentración de norfloxacino, enoxacino y ofloxacino. Siguiendo el procedimiento anteriormente descrito, se realizó la predicción de las concentraciones de los tres analitos utilizando para ello los dos set de calibraciones propuestas. Los resultados se muestran seguidamente en Tabla III. 18, Tabla III. 19 y Tabla III. 20.

Tabla III. 18. Predicciones de enoxacin en las muestras problemas

	Utilizando 6 blancos-orina (único individuo)			Utilizando 16 blancos-orina (diferentes individuos)		
	Ca	Cp (RSD %)	R (%)	Ca	Cp (RSD)	R (%)
Orina 1	105	79.0 (7.4)	75	105	96 (8.8)	92
	79.5	50.3 (6.8)	63	79.5	75 (3.3)	94
	150	88.4 (5.3)	59	150	113 (6.3)	75
Orina 2	150	136 (6.8)	90	150	122 (8.2)	81
	210	158 (8.1)	75	210	162 (12.8)	77
	120	117 (9.9)	97	120	102 (10.2)	85
Orina 3	150	179 (5.1)	119	150	115 (13.5)	77
	210	235 (4.5)	112	210	166 (1,9)	79
	120	179 (3.2)	149	120	95 (12.8)	79
Orina 4	150	238 (5.1)	158	150	128 (15.9)	85
	210	293 (6.6)	140	210	180 (17.7)	86
	120	253 (7.3)	210	120	118 (9.8)	99
Orina 5	150	91 (11.6)	61	150	113 (4.9)	75
	210	128 (4.3)	61	210	167 (3.8)	79
	120	66 (2.6)	55	120	97.6 (4.4)	81
Orina 6	150	99 (6.0)	66	150	110(3.3)	73
	210	134 (8.9)	64	210	155 (7.1)	74
	120	84 (9.4)	70	120	101 (11.9)	84
Orina 7	150	97 (3.2)	65	150	124 (3.5)	83
	210	145 (8.4)	69	210	180 (4.8)	86
	120	64 (19.1)	54	120	102 (7.8)	85
Orina 8	150	54 (2.6)	36	150	113 (5.4)	75
	210	81 (5.8)	38	210	164 (0.6)	78
	120	36 (42)	31	120	103 (9.0)	86
Orina 9	150	67 (27)	45	150	119 (3.4)	80
	210	108 (1.9)	52	210	167 (0.3)	79
	120	53 (12)	54	120	100 (8.9)	83

Tabla III. 19. Predicciones de norfloxacino en las muestras problemas

	Utilizando 6 blancos			Utilizando 16 blancos		
	Ca	Cp (RSD %)	R (%)	Ca	Cp (RSD)	R (%)
Orina 1	15	13.9 (2.9)	92	15	13.8 (2.5)	92
	19.5	17.6 (1.5)	90	19.5	17.7 (3.7)	91
	10.5	9.36 (3.5)	89	10.5	9.32 (4.1)	89
Orina 2	18	16.1 (3.5)	84	18	15.8 (6.3)	88
	10.5	8.89 (2.5)	85	10.5	8.79 (2.4)	84
	12	10.7 (4.4)	89	12	10.8 (1.9)	90
Orina 3	18	14.7 (4.1)	82	18	14.8 (6.6)	88
	10.5	9.1 (6.9)	86	10.5	9.19 (8.7)	87
	12	10.4 (3.1)	86	12	10.3 (3.6)	86
Orina 4	18	16.2 (3.2)	91	18	16.1 (2.3)	89
	10.5	9.4 (5.7)	89	10.5	9.41 (6.1)	90
	12	10.6 (1.4)	89	12	10.6 (3.4)	88
Orina 5	18	16.1 (1.3)	90	18	16.4 (3.5)	91
	10.5	9.62 (0.99)	92	10.5	9.68 (4.5)	92
	12	10.8 (2.8)	90	12	10.6 (2.9)	88
Orina 6	18	13.7 (1.52)	76	18	13.8 (2.2)	77
	10.5	8.56 (0.64)	82	10.5	8.58 (0.9)	82
	12	9.06 (1.6)	76	12	8.82 (3.3)	76
Orina 7	18	16.7 (0.92)	93	18	16.8 (3.0)	93
	10.5	9.79 (1.35)	94	10.5	9.74 (2.6)	93
	12	10.3 (2.8)	85	12	10.2 (0.6)	85
Orina 8	18	13.0 (1.94)	72	18	12.8 (2.3)	71
	10.5	8.01 (2.82)	76	10.5	7.77 (3.4)	74
	12	8.53 (4.46)	71	12	8.29 (2.5)	69
Orina 9	18	12.9 (3.12)	72	18	13.0 (2.5)	72
	10.5	8.55 (3.02)	81	10.5	8.50 (1.4)	81
	12	8.50 (1.62)	71	12	8.52 (2.9)	71

Tabla III. 20. Predicciones de ofloxacin en las muestras problemas

	Utilizando 6 blancos			Utilizando 16 blancos		
	Ca	Cp (RSD %)	R (%)	Ca	Cp (RSD)	R (%)
Orina 1	45	47.9 (2.6)	106	45	47.8 (1.9)	106
	75	75.6 (2.6)	101	75	76.4 (1.6)	102
	30	29.7 (3.0)	99	30	29.7 (2.0)	99
Orina 2	60	56.1 (0.2)	94	60	56.8 (0.6)	95
	22.5	20.2 (7.5)	90	22.5	20.1 (7.5)	89
	60	56.6 (2.1)	94	60	56.6 (2.1)	94
Orina 3	60	52.5 (2.1)	88	60	52.7 (2.1)	88
	22.5	20.3 (1.3)	90	22.5	20.4 (1.1)	91
	60	55.2 (1.6)	92	60	55.2 (1.6)	92
Orina 4	60	58.1 (2.5)	97	60	58.4 (2.7)	97
	22.5	22.3 (4.4)	99	22.5	22.3 (4.4)	99
	60	57.7 (1.0)	96	60	57.8 (0.8)	96
Orina 5	60	58.4 (1.6)	97	60	58.6 (2.0)	98
	22.5	21.6 (1.5)	96	22.5	21.6 (1.4)	96
	60	57.0 (1.3)	95	60	57.0 (1.1)	95
Orina 6	60	60.8 (1.5)	101	60	61.1 (1.3)	102
	22.5	24.1 (3.8)	107	22.5	24.0 (3.8)	107
	60	62.2 (0.7)	104	60	62.1 (0.5)	103
Orina 7	60	59.9 (3.5)	100	60	59.9 (3.4)	100
	22.5	22.0 (3.9)	98	22.5	22.1 (4.2)	98
	60	56.5 (1.2)	94	60	56.7 (1.3)	95
Orina 8	60	60.1 (0.51)	100	60	60.3 (0.6)	100
	22.5	22.4 (5.3)	100	22.5	22.4 (5.1)	99
	60	57.3 (1.2)	96	60	57.4 (1.4)	96
Orina 9	60	58.5 (2.2)	98	60	59.0 (1.7)	98
	22.5	23.7 (3.3)	105	22.5	23.7 (2.9)	105
	60	59.3 (3.6)	99	60	59.4 (3.6)	99

De acuerdo con los resultados mostrados en las tablas anteriores, concluimos que es cuando se hace uso de las 16 disoluciones blancos-orina cuando, se obtienen resultados mejores, siendo el ofloxacino el que presenta una mejor recuperación. Enoxacino y norfloxacino presentan recuperaciones más bajas, pero en cualquier caso superiores a las encontradas en la bibliografía.

En la Figura III. 11 esta representado los porcentajes de recuperación para cada una de las orinas y analitos.

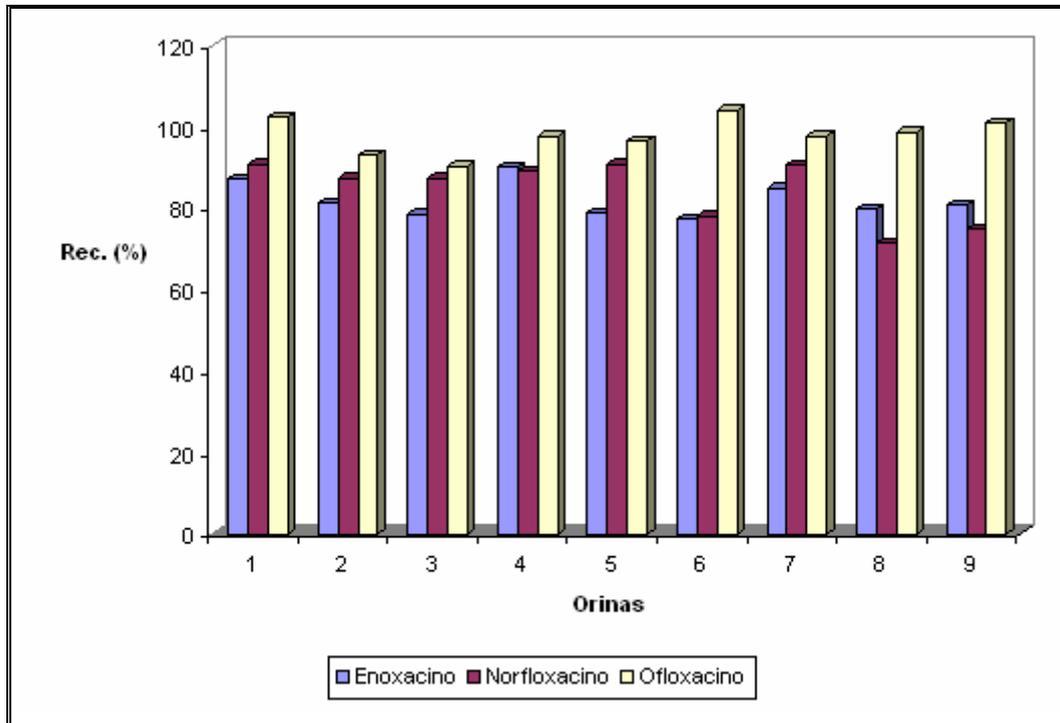


Figura III. 11. Recuperaciones medias (n=3) de enoxacino, norfloxacino y ofloxacino en muestras de orina de nueve individuos diferentes.

Por último se llevó a cabo la validación del modelo comparando los resultados obtenidos en el análisis de cinco muestras de orina con un método cromatográfico³⁵. En las Tablas III.22, III.23 y III.24 se puede observar la adecuada regresión puesto frente a encontrado.

Tabla III.22. Determinación de enoxacin en presencia de norfloxacin y ofloxacin, en orina humana

Muestra ^a	Enoxacin (ng/mL)			
	Actual ^b	40	80	160
Orina 1	Método propuesto ^c	34.8	70.0	128.0
	HPLC ^d	38.0	72.0	136.0
Orina 2	Método propuesto ^c	39.6	68.0	137.6
	HPLC ^d	43.6	75.2	152.0
Orina 3	Método propuesto ^c	32.4	63.2	136.0
	HPLC ^d	36.0	69.6	134.4
Orina 4	Método propuesto ^c	33.6	66.4	138.0
	HPLC ^d	37.2	69.6	133.0
Orina 5	Método propuesto ^c	34.0	66.4	137.6
	HPLC ^d	37.2	72.0	139.2
Ecuaciones	Método propuesto	$[ENO]_{\text{calculada}} = 0.43 + 0.84 [ENO]_{\text{actual}}$ $R^2 = 0.9958$		
	HPLC	$[ENO]_{\text{calculada}} = 4.78 + 0.83 [ENO]_{\text{actual}}$ $R^2 = 0.9890$		

^a Muestras de orina procedentes de cinco personas diferentes.

^b Expresado como ng/mL en orina diluida (1:3000).

^c n = 3.

^d De acuerdo con cita 35

³⁵ Carlucci, G., Journal of Chromatography A, 812, 343,1998

Tabla III.23. Determinación norfloxacinó en presencia de enoxacinó y ofloxacinó, en orina humana

Muestra ^a	Norfloxacinó (ng/mL)			
	Actual ^b	10	12	24
Orina 1	Método propuesto ^c	8.4	10.8	21.1
	HPLC ^d	9.3	11.3	23.3
Orina 2	Método propuesto ^c	8.8	10.8	21.4
	HPLC ^d	8.9	11.2	22.3
Orina 3	Método propuesto ^c	8.8	11.0	21.8
	HPLC ^d	9.7	12.1	22.3
Orina 4	Método propuesto ^c	8.2	9.1	18.5
	HPLC ^d	9.0	10.1	19.9
Orina 5	Método propuesto ^c	8.5	11.1	22.3
	HPLC ^d	9.3	11.8	22.5
Ecuaciones	Método propuesto	$[NOR]_{calculada} = 0.17 + 0.88 [NOR]_{actual}$ $R^2 = 0.9738$		
	HPLC	$[NOR]_{calculada} = 0.26 + 0.90 [NOR]_{actual}$ $R^2 = 0.9805$		

^a Muestras de orina procedentes de cinco personas diferentes.

^b Expresado como ng/mL en orina diluida (1:3000).

^c n = 3.

^d De acuerdo con cita 35

Tabla III.24. Determinación ofloxacin en presencia de norfloxacin y enoxacin, en orina humana

Muestra ^a	Ofloxacin (ng/mL)			
	Actual ^b	30	60	80
Orina 1	Método propuesto ^c	26.7	56.4	76.0
	HPLC ^d	27.0	57.0	76.8
Orina 2	Método propuesto ^c	29.7	57.6	77.6
	HPLC ^d	30.0	57.0	75.2
Orina 3	Método propuesto ^c	28.8	57.0	78.4
	HPLC ^d	28.5	55.8	76.0
Orina 4	Método propuesto ^c	32.1	61.8	81.6
	HPLC ^d	31.5	66.0	78.4
Orina 5	Método propuesto ^c	29.4	57.0	80.0
	HPLC ^d	29.1	56.4	80.8
Ecuaciones	Método propuesto	$[OFLO]_{\text{calculada}} = 0.17 + 0.98 [OFLO]_{\text{actual}}$ $R^2 = 0.9915$		
	HPLC	$[OFLO]_{\text{calculada}} = 0.34 + 0.96 [OFLO]_{\text{actual}}$ $R^2 = 0.9828$		

^a Muestras de orina procedentes de cinco personas diferentes.

^b Expresado como ng/mL en orina diluida (1:3000).

^c n = 3.

^d De acuerdo con cita 35

Capítulo IV.

**Determinación simultánea de norfloxacinó, enoxacinó y
ofloxacinó mediante PARAFAC.**

Utilización de matrices de excitación y emisión.

1. Introducción.

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 $J \times I$). Estos datos se analizan con métodos de calibración multivariante de primer orden.

Cuando cada muestra produce una matriz (tensor de orden dos, tamaño $J \times L$), como una matriz de excitación-emisión de fluorescencia, una matriz absorbancia-tiempo obtenida en un cromatógrafo con detector de arreglo de diodos, etc., el conjunto de calibración es un cubo (tensor de orden tres, tamaño $J \times L \times I$). 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 IV.1 se resumen las diferentes posibilidades.

Tabla IV.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	otro 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 muestra en las figuras IV. 1 y 2:

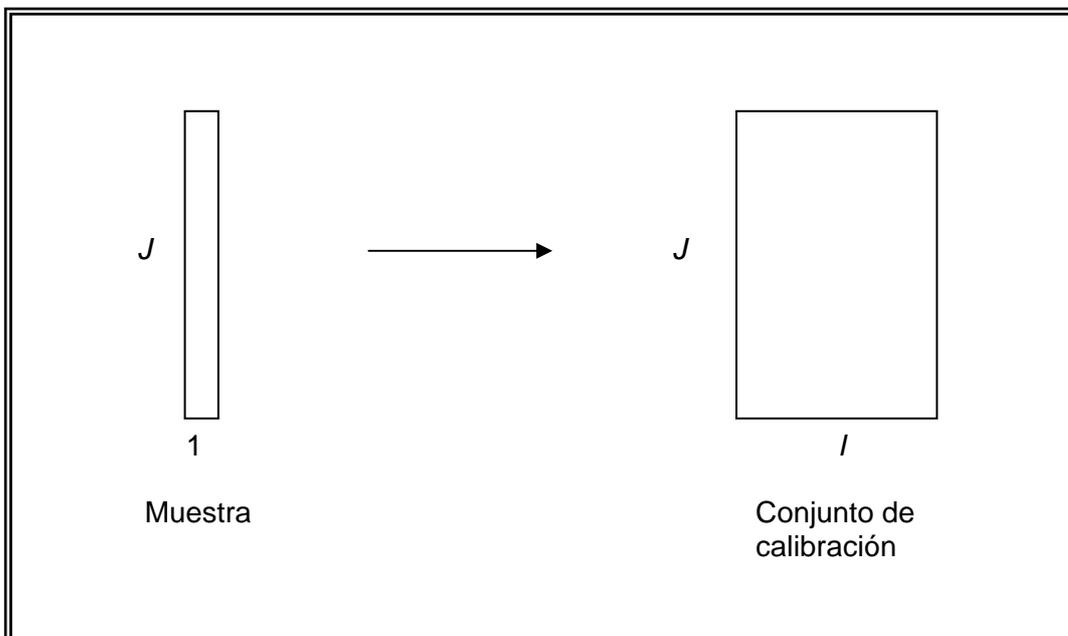


Figura IV. 1. Esquema de calibración de primer orden

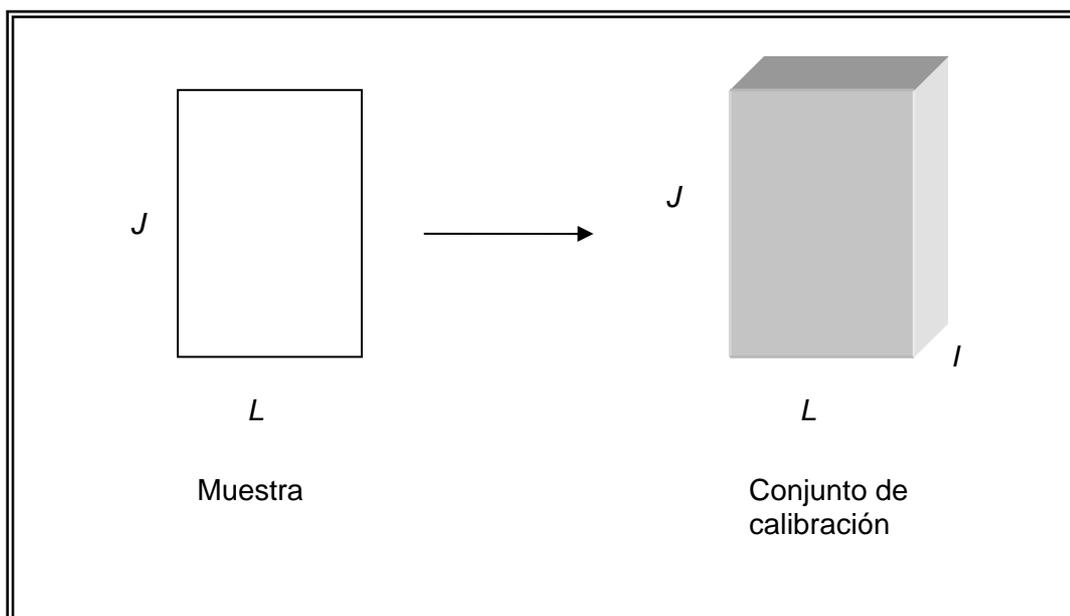


Figura IV. 2.- Esquema de calibración de segundo orden

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 obtenidos como tensores de orden superior, son particularmente útiles en el análisis cuantitativo de mezclas complejas de multicomponentes, y específicamente, los tensores de tercer orden están alcanzando una gran aceptación analítica¹.

Datos multivariantes

Podemos definir a este tipo de datos, como un conjunto de datos que pueden ser organizados del siguiente modo:

$$X_{ijk...} \quad i = 1...I; j = 1...J; k = 1...K$$

Ecuación 1

¹ Booksh, K.S.; Kowalski, B.R., *Analytical Chemistry*, 66, 782A, 1994.

el número de índices puede ser variable. Con un solo índice se trataría de un conjunto univariante o un vector, con dos índices se trataría de una matriz. Si el número de índices es tres, el grupo de datos puede organizarse como un cubo de datos. Cuando los datos están organizados en forma matricial, hablamos de filas y columnas. Para el caso de datos de tres vías, a los vectores se les denominan tubos. Podemos definir una sub-matriz, haciendo fijo el índice del tercer orden. A esta sub-matriz se la denomina *capa* o *corte*. Estas capas pueden ser frontales, horizontales y verticales. En tercer orden, cada una de estas direcciones se denomina modos o vías. El número de niveles en cada modo o vía, se denominan dimensión de ese modo o vía. Podemos hacer una diferenciación entre el número de vías y modos. El número de vías representa la dimensión geométrica de la organización de datos. El número de modos, indica el número de vías independientes.

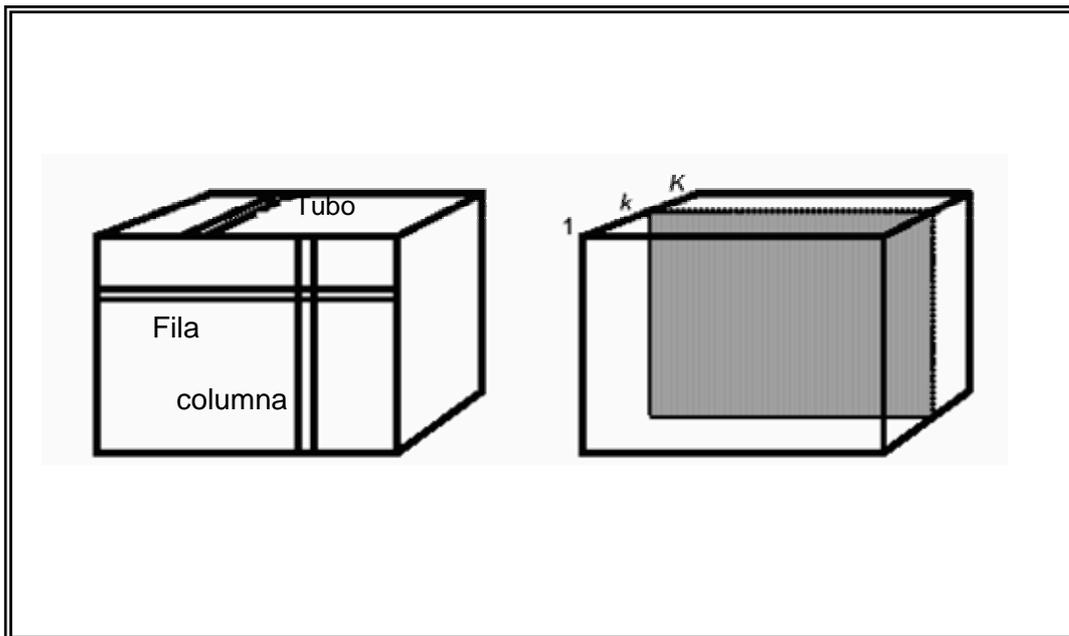


Figura IV. 3 Representación esquemática de tubo, fila y columna (izquierda) y capa k -ésima del conjunto de datos (izquierda).

Representaremos a los números escalares en minúsculas e itálicas, *x*. Los vectores, que generalmente se refieren a vectores columnas, se representarán en minúsculas y negritas, ***x***. Las matrices las representaremos en mayúsculas y negritas, ***X***. Finalmente, los datos de orden superior, se representan en mayúscula, negrita y subrayada, ***X***. Utilizaremos las letras *I*, *J* y *K*, para indicar las dimensiones de la organización.

Concepto de Unfolding

En el tratamiento de datos de tercer 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 IV. 4).

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 de unfolding, se logra cuando se consigue ignorar la estructura multi-variable de los datos, y se tratan como un conjunto de datos de dos vías.

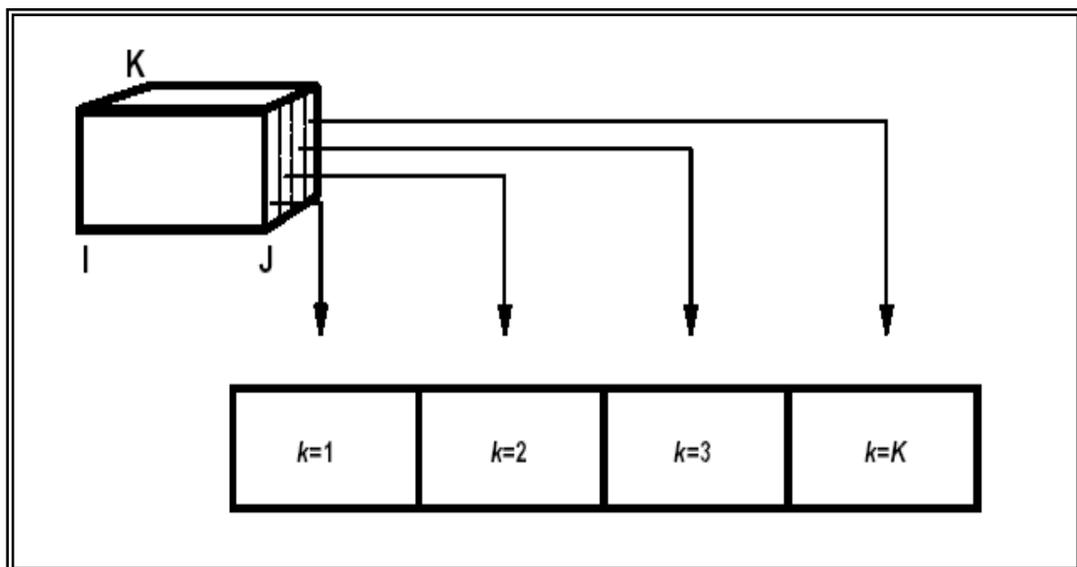


Figura IV. 4.- Representación gráfica del concepto de unfolding

Modelos trilineales

En esta introducción haremos un resumen de los diversos modos de modelos de calibración multivariante.

Un modelo es una aproximación de un conjunto de datos, por ejemplo, la matriz $\hat{\mathbf{X}}$ es un modelo de los datos contenidos en la matriz \mathbf{X} .

A la hora de establecer un modelo, es muy importante llevar a cabo un análisis de los datos. Lo cual nos permitirá fijar tanto la estructura básica, como las restricciones apropiadas del modelo. Una mala elección de estos parámetros, puede incidir en unos malos resultados del modelo en el análisis de los datos, y por tanto en el propósito del trabajo.

Las estructuras de los modelos, que vamos a describir seguidamente, son lineales. Fijando todo un grupo de parámetros, excepto uno, conduce a un modelo lineal en los parámetros no fijados.

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.

La unicidad, es un concepto importante en el análisis multivariante. Que un modelo sea estructuralmente único indica que no es necesario definir más restricciones para identificar a ese modelo. Para un modelo con estructura única, no podemos modificar los parámetros sin que cambie el modelo.

Modelo PARAFAC

PARAFAC, (PARAllel FACtor analysis), es un método de descomposición, que puede ser comparado con el modelo bilineal PCA. Fue propuesto de forma independiente en 1970 por Harshman² y por Carroll y Chang³, 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 tres vías, la descomposición de datos, se hace en triadas o componentes trilineales. En lugar de un vector loading y score, como en PCA; cada componente consiste en un vector score y dos vectores loading.

Una importante diferencia entre PARAFAC y PCA, es que en PARAFAC no es necesario fijar la condición de ortogonalidad para definir el modelo.

❖ Estructura del Modelo

La estructura del modelo se puede definir basándose en una estructura bilineal.

$$\hat{\mathbf{X}}_{ij} = \sum_{f=1}^F \mathbf{a}_{if} \mathbf{b}_{jf} \quad \text{Ecuación 2}$$

Este modelo viene dado por las tres matrices loading, **A**, **B** y **C**, con sus elementos \mathbf{a}_{if} , \mathbf{b}_{jf} y \mathbf{c}_{kf} .

$$\hat{\mathbf{X}}_{ijk} = \sum_{f=1}^F \mathbf{a}_{if} \mathbf{b}_{jf} \mathbf{c}_{kf} \quad \text{Ecuación 3}$$

² R.A. Harsman, *UCLA workings papers in phonetics*, 16, 1979

³ J.Carroll, J. Chang, *Pshicometrika*,35, 1970

Utilizando el producto de Kronecher, el modelo puede escribirse como:

$$\hat{\mathbf{X}}^{(I \times JK)} = \sum_{f=1}^F \mathbf{a}_f (\mathbf{c}_f^T \otimes \mathbf{b}_f^T) \quad \text{Ecuación 4}$$

donde $\hat{\mathbf{X}}^{(I \times JK)}$ es el modelo de tres vías descompuesto en una matriz de $I \times JK$; \mathbf{a}_f , \mathbf{b}_f y \mathbf{c}_f , son las f -ésimas columnas de las matrices loading \mathbf{A} , \mathbf{B} y \mathbf{C} . En notación matricial, PARAFAC puede escribirse como:

$$\mathbf{X}_k = \mathbf{A} \mathbf{D}_k \mathbf{B}^T + \mathbf{E}_k \quad \mathbf{k} = 1 \dots K \quad \text{Ecuación 5}$$

donde \mathbf{D}_k es una matriz diagonal que contiene la fila k -ésima de \mathbf{C} en su diagonal, y \mathbf{E}_k es una matriz de residuos.

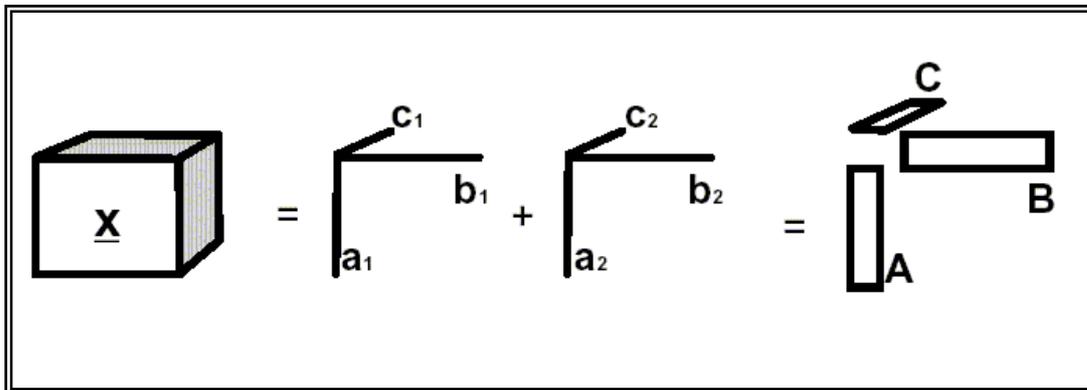


Figura IV. 5. Dos componentes del modelo de tres vías PARAFAC, para una organización de tres vías de datos $\underline{\mathbf{X}}$. (En la figura se ha omitido la matriz \mathbf{E} para simplificar el gráfico)

En la expresión matricial, expresada en la ecuación 5, el modelo PARAFAC parece indicar que los diferentes modos del sistema son tratados de diferente forma; sin embargo PARAFAC, es un modelo simétrico, en el sentido en que si, por ejemplo, una vez establecido un determinado orden, se intercambian el primer modo por el tercero y viceversa, PARAFAC será idéntico para los dos conjuntos de datos, excepto que el vector loading tres habrá pasado a ser el número uno, y al contrario.

En lugar de la expresión matricial mostrada anteriormente, podemos proponer otra expresión matricial más simplificada, introduciendo el denominado producto Khatri-Rao. De acuerdo con esto, PARAFAC puede formularse como:

$$\mathbf{X}^{(IJK)} = \mathbf{A}(\mathbf{C} \otimes \mathbf{B})^T + \mathbf{E}^{(IJK)} \quad \text{Ecuación 6}$$

Omitiendo la matriz de los residuos para simplificar, la ecuación del modelo completo puede escribirse como:

$$\mathbf{X} = \mathbf{AB}^T + \mathbf{E} \quad \text{Ecuación 7}$$

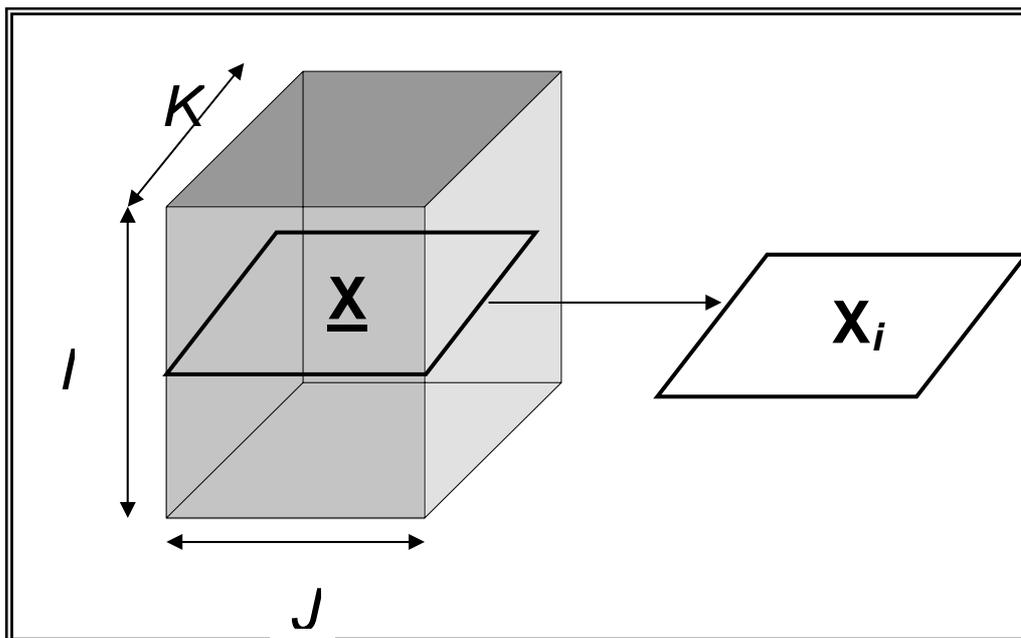


Figura IV. 6. Representación esquemática de datos de tercer orden. A la izquierda el cubo de datos tridimensionales y a la derecha una fracción X_i a lo largo de la dimensión I , es decir, la $J \times K$ EEMM para la muestra i .

❖ **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; pero si se carece de una información externa no es posible encontrar estos espectros puros, debido a los problemas rotacionales mencionados. Este hecho, ha motivado que se propongan nuevos métodos, más interpretativos que PCA y modelos similares (Scarmio y Kubista⁴ 1993, Sarabia y col⁵. 1993, Faber y col^{6,7}. 1994).

⁴ I. Scarmio, M. Kubista, *Analytical Chemistry* 65,409, 1993

⁵ L. Sarabia, M.C. Ortiz, R. Leardi, G. Drava. *Analytical Chemistry* 12, 226, 1993

⁶ N.M. Faber, M.C. Buydens, G. Kateman, *Journal of Chemometrics* 8,147, 1994

⁷ N.M. Faber, L.M.C. Buydens, G.J. Kateman, *Journal of Chemometrics*, 8, 273, 1994

En PARAFAC no encontramos estos problemas que surgen en los modelos bilineales, ya que en la mayoría de los casos el modelo es único, no siendo necesario un post-procesado de los resultados; además este modelo es el mejor en el sentido de ajuste por mínimos cuadrados. Si los datos son aproximadamente trilineales, podemos determinar el fenómeno que se produce realmente, si empleamos un número correcto de factores y una apropiada relación señal-ruido (Harshman⁸ 1972, Kruskal^{9,10,11} 1976-1977). Este hecho fue el que motivó a Harshman a desarrollar la idea de Cattell¹² (1944) de los perfiles paralelos proporcionales. Existen muchos ejemplos en los que PARAFAC coincide con un fenómeno físico, por ejemplo fluorescencia de emisión-excitación, cromatografía con detección espectral, etc. En la Figura IV. 7 podemos ver un ejemplo del carácter de unicidad que tiene PARAFAC en un ejemplo de fluorescencia.

⁸ R.A. Harshman. *UCLA Working Papers in phonetics*, 22, 111, 1972

⁹ J.B. Kruskal, *Psychometrika*, 41, 281, 1976

¹⁰ J.B. Kruskal, *Linear algebra and its applications*, 18,95,1977

¹¹ J.B. Kruskal, *Unpublished manuscript*, Bell Laboratories, Murray Hill, N.J. 1977

¹² R.B. Cattell, *Psychometrika*, 9, 267, 1944

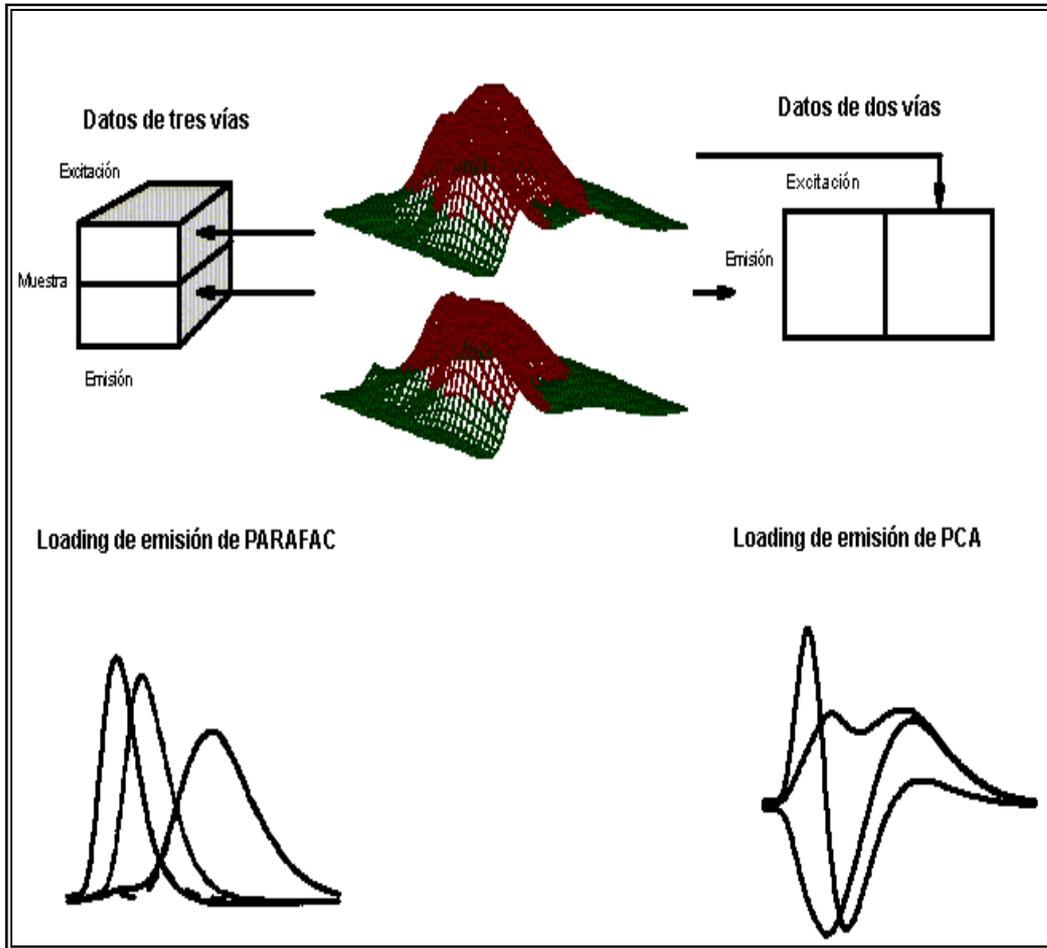


Figura IV. 7. Dos muestras diferentes de tres analitos, a las que se han registrado los espectros de emisión-excitación fluorescentes, dando lugar a dos matrices de datos diferentes. Este conjunto de datos puede organizarse para formar un conjunto de datos de tres vías (izquierda), o descomponerse y formar un conjunto de datos de dos vías (derecha).

Otros modelos trilineales

❖ CANDECOMP

Numerosos modelos trilineales, o en general multivariantes, se han propuesto a parte de PARAFAC. Carroll y Chang¹³ (1970) desarrollaron un modelo idéntico, CANDECOMP, al mismo tiempo que Harshman desarrollaba PARAFAC. Este modelo, CANDECOMP, no está inspirado en los principios básicos establecidos por Cattell¹² (1944), fue desarrollado como una extensión natural en el campo multidimensional. Este modelo no introduce teorías nuevas en el uso de PARAFAC.

❖ PMF3

Modelo trilineal introducido por Paatero¹⁴ (1994). Permite fijar los modelos de dos vías bajo restricciones no negativas utilizando funciones sopesadas. Un aspecto interesante del modelo PMF3 es que no está basado en mínimos cuadrados alternantes. El algoritmo es más rápido que PARAFAC, especialmente para problemas complejos¹⁵.

Uno de los principales problemas que presenta este método, es que la memoria del algoritmo crece de forma importante con la complejidad del problema. En parte este problema se puede solucionar, utilizando un conjunto de datos comprimidos, antes de ajustar el modelo.

¹³ J.D. Carroll, J.Chang, *Psychometrika*, 35, 283, 1970

¹⁴ P. Paatero, *Environmetrics*, 5, 111, 1994

¹⁵ P.K. Hopke, P.Paatero, H. Jlia, R.T. Ross, R.A. Harshman, *Chemometrics Intelligent Laboratory Systems*, 43, 25, 1998

❖ **RAFA, GRAM, DTD**

Con estos acrónimos se nombra a un modelo que tiene mucha relevancia en el campo de la quimiometría.

RAFA:	- rank annihilation factor análisis
GRAFA:	- generalized rank annihilation factor análisis
GRAM:	- generalized rank annihilation method
TLD:	- trilinear decomposition
DTD:	- direct trilinear decomposition
NBRA:	- nonbilinear rank annihilation

RAFA podría considerarse como la madre de todos estos métodos. GRAFA es idéntico a GRAM y TDL es idéntico a DTD.

Ho y colaboradores^{16,17,18} desarrollaron un método denominado *análisis por aniquilación del rango* –RAFA- para la determinación de la concentración de un analito en una matriz desconocida, utilizando únicamente la muestra desconocida y un patrón puro. Esta ventaja, ha sido denominada **ventaja del segundo orden**. Esta propiedad se consigue utilizando la estructura de segundo orden de la muestra individual, en lugar de descomponer y ordenar la matriz en un vector o en una estructura de primer orden.

La ventaja del segundo orden es idéntica a la unicidad que proporciona la estructura trilineal.

La idea subyacente de RAFA está basada en la reducción del rango de la calibración, mediante la sustracción de la contribución del analito de interés.

¹⁶ C.Ho, G. D. Christian, E.R. Davidson, *Analytical Chemistry*, 50, 1108, 1978

¹⁷ C.Ho, G. D. Christian, E.R. Davidson, *Analytical Chemistry*, 52, 1071, 1980

¹⁸ C.Ho, G. D. Christian, E.R. Davidson, *Analytical Chemistry*, 53, 92, 1981

Comparación de DTD con PARAFAC

Tabla IV. 2. Comparación de los modelos DTD y PARAFAC

DTD	PARAFAC
Solo dos (pseudo-) muestras	Cualquier número de muestras
Objetivos desconocidos	Mínimos cuadrados
Algoritmo rápido	Algoritmo lento
Sin restricciones	Posibilidad de aplicar restricciones
Sólo señales de tres vías	Señales de n-vías

Este método requiere señales matriciales para dos muestras, que, de modo muy general, podrían estar compuestas del modo que sigue: una de ellas es la muestra incógnita (mezcla de K analitos), y la otra podría ser alguna de las siguientes posibilidades:

- un estándar puro del analito de interés k
- una mezcla de los K analitos en la que se conoce la concentración de k
- la muestra incógnita a la que se ha agregado una cantidad conocida del analito k
- la muestra incógnita a la que se han agregado varios analitos, incluyendo el analito k , y se conoce sólo la cantidad agregada de k

En cualquiera de estos casos, la aplicación del modelo trilineal implica que las matrices de las dos muestras (etiquetadas como 1 y 2) se pueden escribir como:

$$X_1 = A Y_1 B^T \quad \text{Ecuación 8}$$

$$X_2 = A Y_2 B^T \quad \text{Ecuación 9}$$

En estas ecuaciones, Y_1 e Y_2 son matrices diagonales que contienen las concentraciones de todos los analitos presentes *en ambas mezclas*. Muchas de estas concentraciones pueden no ser conocidas, incluso sólo puede conocerse *la diferencia* entre las concentraciones de un único analito presente en ambas muestras. Más aún, podría no conocerse el número exacto de analitos presentes en ambas muestras. Esto último no es imprescindible, porque, como se verá después, se utilizará el método svd (*singular value decomposition*) para estimar el número de fuentes de variación espectral (y dentro de ellas estará seguramente el analito de interés).

A partir de estas dos ecuaciones puede escribirse:

$$X_1 (B^T)^+ = A Y_1 \quad \text{Ecuación 10}$$

$$X_2 (B^T)^+ = A Y_2 \quad \text{Ecuación 11}$$

Y multiplicando la primera por Y_2 y la segunda por Y_1 :

$$X_1 (B^T)^+ Y_2 = A Y_1 Y_2 \quad \text{Ecuación 12}$$

$$X_2 (B^T)^+ Y_1 = A Y_2 Y_1 \quad \text{Ecuación 13}$$

En estas dos ecuaciones, es necesario que pueda calcularse la pseudoinversa de \mathbf{B}^T , lo que será posible si no hay colinealidades espectrales serias, una limitación similar a la de CLS.

Dado que \mathbf{Y}_1 e \mathbf{Y}_2 son diagonales, su producto es conmutativo, $\mathbf{Y}_1 \times \mathbf{Y}_2 = \mathbf{Y}_2 \times \mathbf{Y}_1$ y por lo tanto:

$$\mathbf{X}_1 (\mathbf{B}^T)^+ \mathbf{Y}_2 = \mathbf{X}_2 (\mathbf{B}^T)^+ \mathbf{Y}_1 \quad \text{Ecuación 14}$$

Para aplicar el método DTD se descompone \mathbf{X}_2 mediante svd, utilizando las matrices truncadas en las que A es igual al número supuesto de analitos (el número A se estima haciendo un análisis de los valores relativos de los valores singulares y el nivel del ruido):

$$\mathbf{X}_2 = \mathbf{U} \mathbf{S} \mathbf{V}^T \quad \text{Ecuación 15}$$

y reemplazando en la ecuación anterior:

$$\mathbf{X}_1 (\mathbf{B}^T)^+ \mathbf{Y}_2 = \mathbf{U} \mathbf{S} \mathbf{V}^T (\mathbf{B}^T)^+ \mathbf{Y}_1 \quad \text{Ecuación 16}$$

Definimos ahora una matriz auxiliar \mathbf{Z} tal que:

$$(\mathbf{B}^T)^+ = \mathbf{V} \mathbf{S}^{-1} \mathbf{Z} \quad \text{Ecuación 17}$$

y reemplazando en la ecuación anterior:

$$\mathbf{X}_1 \times [\mathbf{V} \mathbf{S}^{-1} \mathbf{Z}] \times \mathbf{Y}_2 = \mathbf{U} \mathbf{S} \mathbf{V}^T \times [\mathbf{V} \mathbf{S}^{-1} \mathbf{Z}] \times \mathbf{Y}_1 \quad \text{Ecuación 18}$$

Aprovechando las propiedades de **S** y **V**:

- $\mathbf{S} \mathbf{S}^{-1} = \mathbf{I}$, ya que **S** es diagonal
- $\mathbf{V}^T \mathbf{V} = \mathbf{I}$, ya que **V** es unitaria

se puede llegar a:

$$\mathbf{X}_1 \mathbf{V} \mathbf{S}^{-1} \mathbf{Z} \mathbf{Y}_2 = \mathbf{U} \mathbf{Z} \mathbf{Y}_1 \quad \text{Ecuación 19}$$

Premultiplicando por \mathbf{U}^T y posmultiplicando por $(\mathbf{Y}_2)^{-1}$ se obtiene:

$$[\mathbf{U}^T \mathbf{X}_1 \mathbf{V} \mathbf{S}^{-1}] \times \mathbf{Z} = \mathbf{Z} \times [\mathbf{Y}_1 (\mathbf{Y}_2)^{-1}] \quad \text{Ecuación 20}$$

Esta ecuación tiene la forma:

$$\begin{matrix} \mathbf{H} & \times & \mathbf{Z} & = & \mathbf{Z} & \times & \mathbf{\Lambda} \\ \mathbf{A \times A} & & \mathbf{A \times A} & & \mathbf{A \times A} & & \mathbf{A \times A} \end{matrix} \quad \text{Ecuación 21}$$

y corresponde a un típico problema de autovalores y autovectores. Nótese que la matriz $\mathbf{\Lambda}$ es diagonal, y que sus elementos diagonales son las relaciones de las concentraciones de todos los analitos en la muestra 1 respecto de las de la muestra 2. De esta forma, la ecuación anterior es equivalente a A ecuaciones del tipo:

$$\mathbf{H} \times (\text{Columna } a \text{ de } \mathbf{Z}) = (\text{Columna } a \text{ de } \mathbf{Z}) \times \mathbf{\Lambda}_{aa} \quad \text{Ecuación 22}$$

que es un típico problema de autovectores y autovalores.

En definitiva, conociendo la matriz **H**, que se construye a partir de **X**₁ y de la svd de **X**₂, o sea, desconociendo todas las concentraciones y los analitos, se pueden calcular los **A elementos diagonales** de Λ . Estos últimos elementos son **las relaciones de concentración de los analitos en las dos muestras, lo cual significa que, excepto por un factor de proporcionalidad, se conocen las concentraciones relativas de todos los analitos únicamente a partir de la medida de las señales matriciales**. Equivale a afirmar que el cubo de muestras de calibración (tamaño $J \times L \times 2$) fue descompuesto en un modelo trilineal que provee **A**, **B** e **Y**, excepto por un factor de proporcionalidad. Por este motivo al método se lo llama descomposición trilineal directa.

El factor de proporcionalidad desconocido se obtiene mediante el conocimiento de la concentración del analito de interés en una de las muestras, o de la concentración agregada de este analito a la muestra incógnita, dependiendo del método utilizado para construir el cubo de calibración.

Debido a que los autovalores de la matriz **H** (coloquialmente denominados factores) se obtienen al azar, es necesario identificar cuál de ellos corresponde al analito de interés k . Hay varias posibilidades:

- Si la muestra 1 es un estándar del analito de interés puro, entonces todos los autovalores son cero, excepto el que corresponde a k
- Si la muestra 1 es la incógnita más analito k agregado, todos los autovalores son uno, excepto el que corresponde a k
- En cualquier otro caso, y en general, el analito k se identifica a partir de los perfiles de excitación y emisión contenidos en **A** y **B**

En el último caso, los perfiles **A** y **B** se obtienen a partir de:

$$(\mathbf{B}^T)^+ = \mathbf{V} \mathbf{S}^{-1} \mathbf{Z} \quad \Rightarrow \quad (\mathbf{B}^+)^T = \mathbf{V} \mathbf{S}^{-1} \mathbf{Z} \quad \Rightarrow \quad \mathbf{B}^+ = \mathbf{Z}^T (\mathbf{S}^{-1})^T \mathbf{V}^T$$

$\Rightarrow (\mathbf{B}^T)^+ = \mathbf{V} \mathbf{S}^{-1} \mathbf{Z}$ (Posible porque **S** es diagonal y **Z** y **V** contienen autovectores)

$$\mathbf{A} \mathbf{Y}_2 = \mathbf{X}_2 (\mathbf{B}^T)^+ = \mathbf{X}_2 \mathbf{V} \mathbf{S}^{-1} \mathbf{Z} = \mathbf{U} \mathbf{S} \mathbf{V}^T \mathbf{V} \mathbf{S}^{-1} \mathbf{Z} = \mathbf{U} \mathbf{Z} \quad \Rightarrow \quad \mathbf{A} = \mathbf{U} \mathbf{Z} (\mathbf{Y}_2)^{-1}$$

Examinando los perfiles de emisión **A** y de excitación **B**, se pueden identificar los correspondientes al analito *k*, y adjudicar el autovalor correspondiente Λ_{kk} . Hay dos posibilidades:

- 1. Si se conoce la concentración de *k* en alguna de las dos muestras (por ejemplo la número 1):

$$\Lambda_{kk} = \frac{\text{Concentración de } k \text{ en 1}}{\text{Concentración de } k \text{ en 2}}$$

se puede obtener la concentración de *k* en la muestra 2:

$$\text{Concentración de } k \text{ en 2} = (\text{Concentración de } k \text{ en 1}) / \Lambda_{kk}$$

- 2. Si se conoce la concentración agregada de *k* a la muestra incógnita 1:

$$\Lambda_{kk} = \frac{\text{Concentración de } k \text{ en 1}}{\text{Concentración de } k \text{ en 2}} = \frac{\text{Concentración de } k \text{ en 1}}{\text{Concentración de } k \text{ en 1} + \text{Concentración agregada de } k}$$

de donde se puede obtener la concentración de *k* en la muestra 2 como:

$$\text{Concentración de } k \text{ en 2} = (\text{Concentración de } k \text{ en 1}) \times \Lambda_{kk} / (1 - \Lambda_{kk})$$

Regresión multilínea por mínimos cuadrados parciales (n-PLS)

En el capítulo III, hemos 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 segundo orden.

Para ello, podemos comenzar considerando los modelos de dos vías. Se pueden describir considerándolos en dos pasos. Para cada componente se construye un modelo de una línea de ambos X e y . Entonces, estos modelos se sustraen desde X e y , y se forma un nuevo grupo de componentes de los residuales. El cálculo de los componentes es la parte esencial del algoritmo, y puede ser considerado como un problema de determinación de los vectores de peso, \mathbf{w} , para maximizar una determinada función.

Para calcular un componente mediante PLS de dos vías, el modelo para un componente se puede expresar de la forma: $\bar{x}_{ij} = t_i w_j$ donde t s son scores y w s pesos. Para un determinado \mathbf{w} , \mathbf{t} se puede calcular por mínimos cuadrados

como: $\mathbf{t} = \mathbf{X} \mathbf{w}$; o bien usando la expresión sumatoria: $t_i = \sum_{j=1}^J x_{ij} w_j$

La ecuación para encontrar el primer componente como:

$$\max_{\mathbf{w}} \left[\text{cov}(\mathbf{t}, \mathbf{y}) \mid t_i = \sum_{j=1}^J x_{ij} w_j \mid \|\mathbf{w}\|_F^2 = 1 \right] \quad \text{Ecuación 23}$$

Esta expresión permite encontrar un vector \mathbf{w} , que genera un vector score \mathbf{t} , que presenta máxima covarianza con \mathbf{y} . La covarianza entre \mathbf{t} e \mathbf{y} puede ser también expresada mediante una función sumatoria.

Como \mathbf{X} e \mathbf{y} son conocidos de antemano la sumatoria de i se puede hacer antes del calculo de \mathbf{w} . Esta sumatoria da un vector $J \times 1$, denominado \mathbf{z} de

manera que
$$\max_{\mathbf{w}} \left[\sum_{j=1}^J z_j w_j \quad \|\mathbf{w}\|_F^2 = 1 \right]$$

Cuando \mathbf{w} es un vector unitario en la misma dirección que \mathbf{z} , \mathbf{w} se puede calcular como :

$$w = \frac{z}{\|z\|_F} = \frac{X^T y}{\|X^T y\|_F} \quad \text{Ecuación 24}$$

Para un sistema de tres vías de variables independientes el objetivo del algoritmo es hacer una descomposición de $\underline{\mathbf{X}}$ en triadas. Una triada está formada por un score \mathbf{t} y dos vectores de peso; uno en el segundo modo llamado \mathbf{w}^J y uno en el tercer modo llamado \mathbf{w}^K . El modelo de $\underline{\mathbf{X}}$ está dado por:

$$\bar{x}_{ijk} = t_i w_j^J w_k^K; i = 1, \dots, I; j = 1, \dots, J; k = 1, \dots, K$$

Por la misma razón que en PLS, el tri-PLS tiene como objetivo buscar vectores de peso \mathbf{w}^J y \mathbf{w}^K . Estos vectores deben producir la máxima covarianza con \mathbf{y} .

Preprocesado de datos

El preprocesado de datos de órdenes elevados es más difícil que el del caso de datos de dos vías. El centrado tiene el mismo propósito que cuando se usan dos vías, eliminar términos constantes en los datos, que podrían aportar componentes extras haciendo el inviable el proceso de modelado.

El centrado de una serie de datos se puede realizar por desdoblamiento en una matriz $I \times JK$ y entonces centrar esta matriz como en un método común de dos vías, a menudo se le denomina centrado simple.

$$x_{ijk}^{cent} = x_{ijk} - \frac{\sum_{i=1}^I x_{ijk}}{I} \quad \text{Ecuación 25}$$

También se le denomina centrado a través del primer modo, y es el apropiado para llevar a cabo con PARAFAC. Este método básicamente elimina los niveles constantes para un modo en particular.

Número de componentes

Es difícil decidir el mejor rango de la mayoría de los modelos multivariantes de varias vías. Sin embargo es necesario para poder construir un buen modelo. Un paso importante y previo debe ser conocer los espectros de los analitos siempre que sea posible. Existen varios modos de afrontar esta decisión: 1.- por análisis de residuos; 2.- Validación cruzada y 3.- Diagnóstico de la consistencia del modelo (Core consistency), entre otros.

1.- Las características de un modelo se pueden realizar por el análisis de los residuos del modelo. Si el residuo sufre una variación sistemática indica que se deben considerar más componentes. Si una representación de la suma de los cuadrados de los residuos frente al número de componentes prácticamente alcanza un valor constante para un determinado número de componentes, se puede considerar que se ha alcanzado un número óptimo de los mismos.

2.- La validación cruzada y otros métodos similares se emplean para determinar la dimensión del modelo. Aunque se emplean ampliamente en modelos de dos vías, actualmente están aún en desarrollo en modelos de tres vías¹⁹.

3.- Un nuevo modo denominado **diagnostico de la consistencia del modelo** o bien en su terminología inglesa aceptada “Core consistency diagnostic”²⁰, se aplica al análisis multivariante de tres vías, especialmente a PARAFAC.

La expresión para este parámetro es:

$$Core\ consistency = 100 \left[\frac{1 - \sum_{d=1}^F \sum_{e=1}^F \sum_{f=1}^F (g_{def} - t_{def})^2}{\sum_{d=1}^F \sum_{e=1}^F \sum_{f=1}^F t_{def}^2} \right] \quad \text{Ecuación 26}$$

Si el modelo optimizado PARAFAC es valido entonces **G** se aproxima a **T**. Si los datos no se aproximan al modelo entonces se obtendrá una diferencia sustancial entre **G** y **T**. Siendo **G** la denominada superdiagonalidad y **T** la denominada superidentidad. 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 según aumenta el número de componentes. Después de aplicar el número máximo de componentes 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 componentes.

¹⁹ H.T. Eastment, W.J. Krzanowski, *Technometrics*, 24, 73, 1982

²⁰ Bro, R.; Kiers, HAL.; *Journal of Chemometrics*, 17, 274, 2004

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”. Generalmente el valor del core estará próximo al 100% y disminuirá bruscamente hasta valores muy pequeños incluso próximos a 0.1. Dicho comportamiento se puede observar en la Figura IV.8.

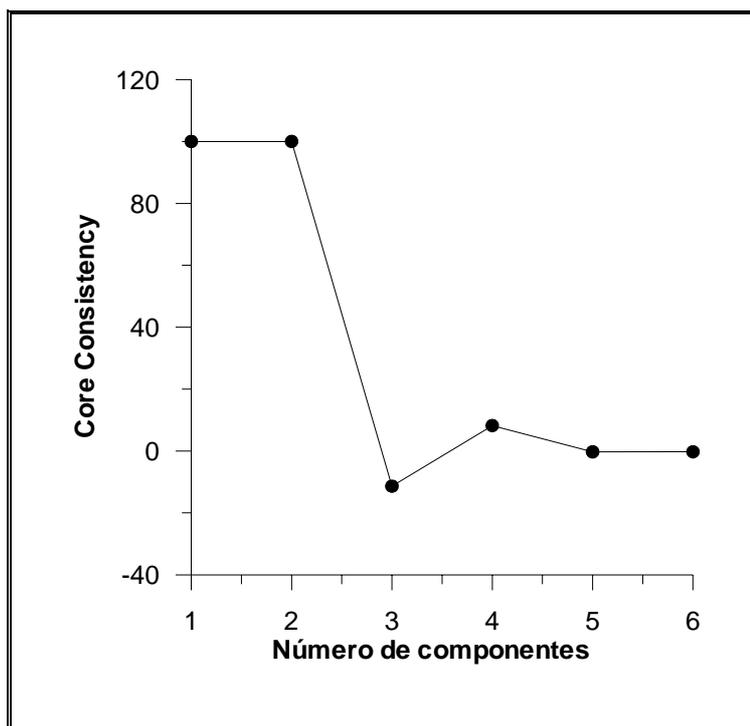


Figura IV. 8. Representación del *core consistency* en función del número de componentes para la determinación de carbamacepina y su epóxido, en presencia de suero, mediante PARAFAC²¹.

²¹ Escandar, G.M., González Gómez, D.; Espinosa Mansilla, A.; Muñoz de la Peña, A.; Goicoechea, C.H.; *Analytical Chimica Acta*, 506, 161, 2004

Aspectos relacionados con las características de PLS, nPLS y PARAFAC

Todos los algoritmos indicados son para análisis multivariante aplicables a diversos tipos de señales ópticas, eléctricas y cromatográficas.

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 le confieren diferentes capacidades de resolución y por tanto diversos campos de actuación.

- n PLS, utilizada señales de tres vías, 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 rápidos en los procesos de predicción. Sin embargo cuando se aplica a la resolución de componentes en presencia de un fondo que presenta amplia señal y gran variabilidad en función del caso concreto de análisis, 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 él, en ausencia de los analitos de interés.

Esta forma de actuación tiene la limitación de que nunca realmente se esta disponiendo del fondo, llamemos interferencia, real, que incluso en algunos casos no se puede disponer de ella y que el número de muestras fondo necesarias 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 resolución de n PLS y la rapidez de predicción puede generar procedimientos competitivos incluso con HPLC, de forma similar a como lo hace PLS para sistemas más simples.

- 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 sin embargo nos asegura que el fondo de la muestra está siendo modelado.

Creemos por tanto conveniente aplicar PARAFAC al análisis de ENO, NOR y OFLO en suero dado la imposibilidad de realizarlo mediante señales bidimensionales dada la elevada señal de fluorescencia mostrada por el suero a las diluciones que nos permiten llegar a las concentraciones terapéuticas de las fluoroquinolonas y por otra parte, la gran variabilidad de dicha señal entre individuos.

2. Determinación simultánea de Norfloxacin, Enoxacin y Ofloxacin en suero plasmático

Como se expuso anteriormente en el capítulo II, las fluoroquinolonas estudiadas presentan una importante fluorescencia en disolución. Estas propiedades fluorescente están muy influenciadas por las condiciones del medio, como es el disolvente empleado, la acidez fijada y, como se pudo demostrar, por el grado de rigidez del mismo. En el capítulo anterior se han optimizado unas condiciones experimentales que nos permiten llevar a cabo su estudio de forma simultánea mediante el análisis de sus propiedades fluorescentes. Se empleó como disolvente etanol, para el caso de las disoluciones concentradas, mientras que las correspondientes disoluciones de trabajo, se preparan a partir de las anteriores, en medio acuoso. También se comprobó que la acidez idónea de trabajo, es a un valor de pH 4.0, por lo que todas las disoluciones de trabajo se preparan fijando esta acidez mediante el empleo del tampón acético-acetato, en las mismas condiciones que las vistas anteriormente. Finalmente, se pudo comprobar que un incremento en la rigidez del medio, mediante el empleo de un agente micelar, provoca un aumento considerable de la sensibilidad, por lo que se estudió que concentración de tensoactivo, produce el mayor incremento de sensibilidad, por lo que se concluye trabajar con una concentración de dodecilsulfato sódico, como agente micelar, de 12.0 mM.

La posibilidad de determinar estos tres analitos de forma simultánea en orina se pudo llevar a cabo mediante PLS. Sin embargo, en presencia de suero, y aplicando calibración multivariante de primer orden, dicha resolución no fue fructuosa; ya que el grado de solapamiento entre las señales de los analitos y el suero, es tan elevado que desborda las capacidades resolutorias de metodologías tales como PLS. Hay que recordar, llegados a este punto, que PLS utiliza para la calibración matrices de calibración compuestas solo por mezclas patrón de los analitos de interés.

El empleo de métodos de calibración multivariante de segundo orden, que en nuestro caso serán señales de emisión-excitación fluorescente, aporta una mayor información espectral y, por tanto, una mayor diferenciación espectral entre los diversos componentes. Por otra parte, PARAFAC aprovecha las capacidades inherentes a la denominada “*ventaja de segundo orden*”, basada en el hecho de utilizar para la calibración las muestras patrones de los componentes en unión de la propia muestra problema. Como consecuencia, es capaz de modular matrices complejas y nos permite determinar de forma simultánea a estos tres analitos, sin necesidad de llevar a cabo una separación, en presencia de suero plasmático. Para ello es necesario como ya se ha indicado utilizar señales de segundo orden

En las condiciones experimentales indicadas anteriormente, la máxima información fluorescente de estas tres fluoroquinolonas, se obtiene entre las longitudes de onda de emisión comprendidas entre 360-540 nm, fijando la excitación en 277 nm.

Calibración y set de validación.

Para la construcción de la matriz de calibración del modelo, se siguió un diseño central compuesto, formado por un diseño factorial completo de tres componentes a dos niveles ($2^3 = 8$ muestras), un punto central (una muestra), y un punto en cada uno de los vértices del cubo (seis muestras), con lo que el número total de muestras necesarias para construir el modelo es quince. (Muestras C1-C15).

También se prepararon un total de ocho muestras formadas por mezclas ternarias, (T1-T8), construidas con diferentes concentraciones de analito, diferentes de las empleadas para la calibración, pero dentro de los mismos intervalos de concentraciones. Este grupo de muestras será utilizado para validar el modelo.

Tabla IV. 3.- Composición de la matriz de calibración y del conjunto de predicción.

MUESTRA	NORFLOXACINO	ENOXACINO	OFLOXACINO
	Concentración µg/L		
C1	5.28	63.40	16.90
C2	5.28	63.40	63.10
C3	5.28	237.00	16.90
C4	5.28	237.00	63.10
C5	19.70	63.40	16.90
C6	19.70	63.40	63.10
C7	19.70	237.00	16.90
C8	19.70	237.00	63.10
C9	0.00	150.00	40.00
C10	25.00	150.00	40.00
C11	12.50	0.00	40.00
C12	12.50	300.00	40.00
C13	12.50	150.00	0.00
C14	12.50	150.00	80.00
C15	12.50	150.0	40.00
T1	6.00	300.00	20.00
T2	10.00	250.00	40.00
T3	6.00	250.00	40.00
T4	10.00	300.00	20.00
T5	12.00	200.00	60.00
T6	20.00	150.00	80.00
T7	20.00	150.00	80.00
T8	12.00	200.00	60.00

Calibración multivariante con datos de tercer orden.

Existen tres puntos importantes que hay que reseñar, a la hora de aplicar el modelo PARAFAC para datos fluorescentes de tercer orden.

- Cómo establecer el número de fluoróforos
- Cómo identificar un componente fluorescente específico, a partir de la información suministrada por el modelo
- Cómo calibrar el modelo de manera que nos permita obtener la concentración absoluta, de un determinado componente en una muestra desconocida

El número de componentes (N) puede estimarse de muy diferentes modos. Uno de ellos, es la consideración de uno de los parámetros internos de PARAFAC, conocido como *core consistency*²⁰. También es posible llevar a cabo un método alternativo, y más intuitivo basado en la recta de calibración pseudo univariante, que se obtiene representando las concentraciones relativas obtenidas con PARAFAC, con respecto a las muestras de calibración. El valor correcto de N , se localiza fácilmente cuando el error de este ajuste se estabiliza a partir de un determinado valor, como una función de un número de componentes de prueba.

La identificación de los diferentes componentes, objeto de estudio, se realiza a través de los perfiles espectrales de **B** y **C**, que son extraídos de toda la información espectral a partir de PARAFAC, y que pueden ser comparados con los generados por los patrones puros de dichos analitos.

Una vez realizada la calibración, se obtiene la concentración absoluta de cada analito. Hay que tener en cuenta que, mediante la descomposición del cubo de datos, tan sólo se obtienen valores relativos (**A**). Experimentalmente, esto se lleva a cabo preparando un conjunto de muestras patrones, de concentración conocida.

Existen dos alternativas para realizar la calibración. La primera de ellas conlleva la descomposición del cubo formado por las I mezclas de calibración, y empleando **B** y **C** para la predicción de las muestras incógnitas. Este método no aprovecha de forma completa la *ventaja de segundo orden*, ya que la muestra incógnita puede contener constituyentes que no están modelados en las muestras de calibración.

Un segundo método, que ha sido el empleado por nosotros, conlleva la descomposición del cubo de datos formado por la unión de las señales de emisión-excitación de las I muestras de calibración, junto con la muestra desconocida. Este segundo método es el que se ha utilizado en el presente trabajo de investigación; con ello se logra la ventaja de la descomposición única del cubo de datos; lo cual nos permite obtener la concentración del analito de interés en presencia de interferencias no identificadas.

Tabla IV. 4.- Descripción de las dos alternativas de calibración para datos de tres-vías usando PARAFAC.

PASO	MODO 1 ^(a)	MODO 2
1	Construcción del cubo de datos de dimensiones $I \times J \times K$ con las I EEMs para las I muestras de calibración	Construcción del cubo de datos de dimensiones $(I+1) \times J \times K$ con las I EEMs para las I muestras de calibración y con la muestra incógnita
2	Descomposición del cubo para obtener A, B y C	Descomposición del cubo para obtener A, B y C
3	Identificación del analito de interés (n) a partir de los perfiles espectrales de B y C	Identificación del analito de interés (n) a partir de los perfiles espectrales de B y C
4	Determinación de la concentración relativa del analito de interés; $a_{unk} = Z^+ \text{vec}(F_{unk})$, y selección del analito de interés: $a_{unk,n}$	Realizar la regresión con el primer I elemento de la columna A_n con respecto a las concentraciones conocidas c_{cal} del analito n : $[A_{1,n} \dots A_{I,n}] = k \times c_{cal}$ (pseudo calibración univariante)
5	Realizar la regresión de los I elementos de la columna A_n con respecto a la concentración c_{cal} para el analito n : $A_n = k \times c_{cal}$	Convertir las concentraciones relativas a concentraciones absolutas de n en la incógnita, empezando por el último elemento de la columna A_n : $c_{unk} = A_{I+1,n} / k$
6	Convertir las concentraciones relativas a concentraciones absolutas de n en la incógnita: $c_{unk} = A_{unk,n} / k$	

^(a) En el paso 4, $Z = C \otimes B$ donde el símbolo \otimes significa el producto Khatri-Rao²²

Para el segundo método de calibración, los pasos 1-5 indicados en la tabla IV.4 deben repetirse para cada una de las nuevas muestras a analizar.

²² Rao, C.R.; Mitra, S. *Generalized Inverse of Matrices and its Applications*, Wiley: New York, 1971

Software utilizado

Para todos los cálculos realizados, se ha utilizado el paquete informático MATLAB 5.3²³. Para los cálculos realizados con PLS-1 se empleó una rutina específica, programada en MATLAB 5.3²⁴. En el caso de nPLS y PARAFAC, las rutinas se encuentran disponibles de forma libre en Internet (<http://www.modelss.kvl.dk/source/>), aunque para facilitar los cálculos se realizó una interface gráfica, que facilita tanto la manipulación de datos como el tratamiento de los gráficos. Esta interface nos proporciona una forma sencilla de introducir los datos experimentales, en forma matricial, en el entorno de trabajo de MATLAB, antes de aplicar la rutina PARAFAC.

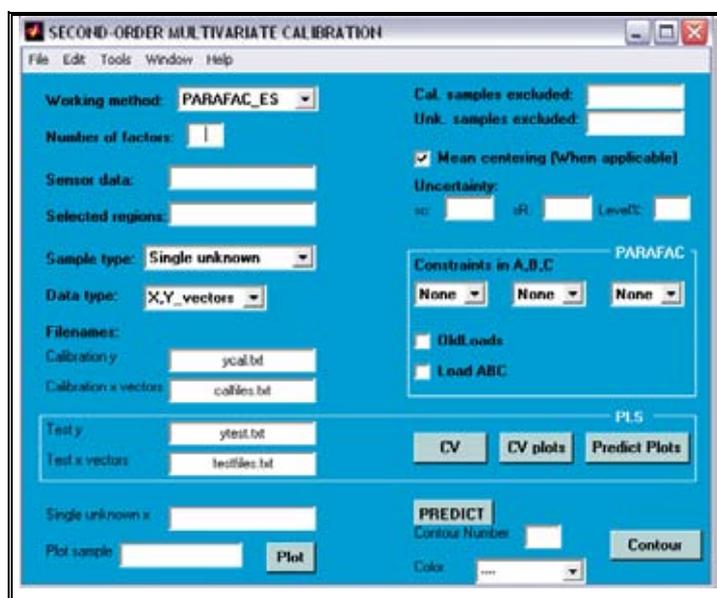


Figura IV. 9. Pantalla principal para realizar cálculos de calibración multivariada de segundo orden

²³ MATLAB 5.3, The Math Works Inc., Natick, Massachussets, USA, 1999

²⁴ Alejandro C. Olivieri. *Departamento de Química Analítica*. Facultad de Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional de Rosario (Argentina) 2002

Análisis de las matrices de Excitación-Emisión fluorescente

En la Figura IV. 10 se muestra el espectro tridimensional correspondiente a las intensidades de emisión-excitación fluorescente para el patrón de calibración C1, en el intervalo total de longitudes de onda de emisión y excitación. Se observa la presencia de las señales de dispersión Rayleigh y Raman, así como el segundo armónico de difracción de los monocromadores.

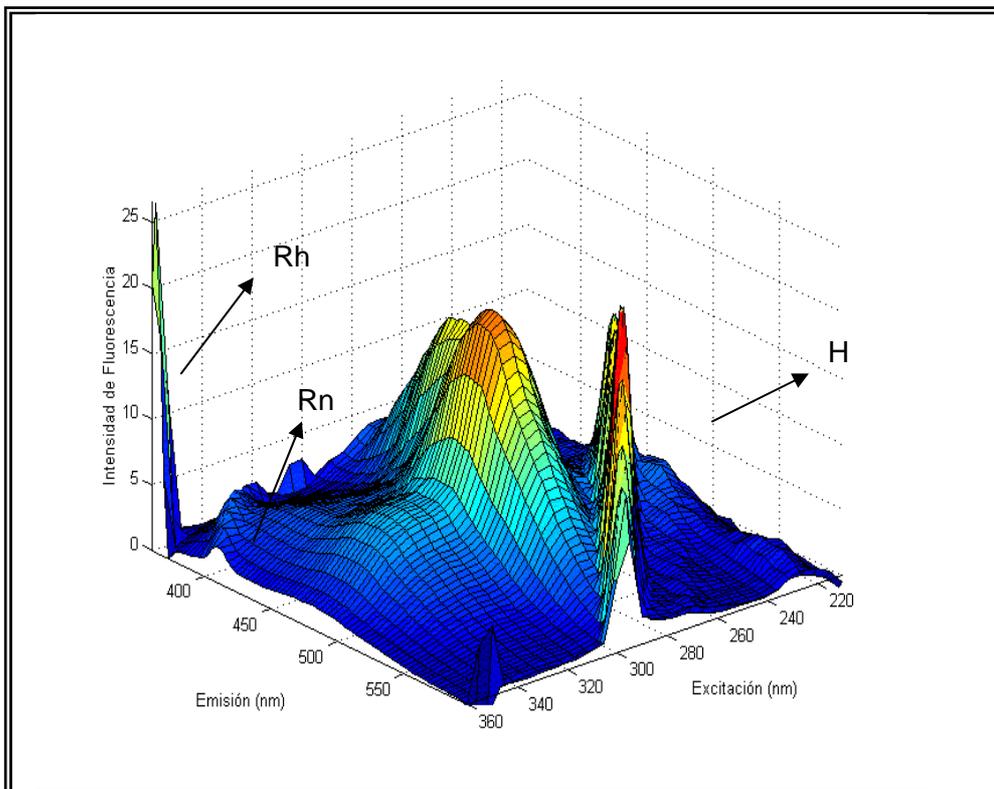


Figura IV.10. Representación tridimensional de emisión-excitación, para la muestra de calibración C1, donde se observa la presencia la difracción de los armónicos de los monocromadores (H), y las dispersiones Rayleigh (Rh) y Raman (Rn).

Como se ha observado en la figura anterior, existen señales procedentes de procesos que no están relacionados con la concentración de los analitos. Para soslayar este hecho, se ha reducido el rango de longitudes de onda de emisión y excitación, tanto para la calibración como para la cuantificación de las muestras problemas. La región espectral seleccionada es de 378 a 501 nm con un incremento de 3 nm para el caso de la emisión ($J = 42$) y de 260 a 330 en intervalos de 5 nm para la excitación ($K = 15$), lo que da lugar a un total de 630 puntos espectrales.

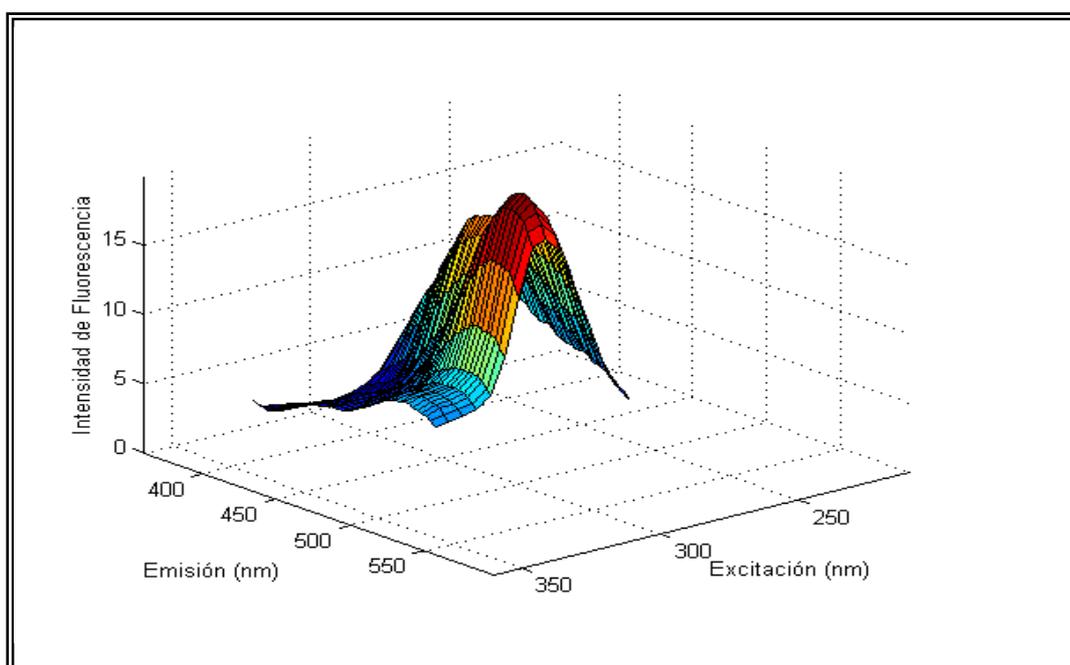


Figura IV. 11.- Representación de la matriz de fluorescencia del patrón de calibración C1 en la región espectral seleccionada.

Método de calibración y validación en conjunto de predicción

Se registraron los espectros unidimensionales de emisión fluorescente, a la longitud de onda de excitación de compromiso de 277 nm, para el conjunto de muestras de la tabla IV. 3; ya que en primer lugar estas muestras fueron analizadas mediante PLS-1. Nuevamente se seleccionó una región espectral adecuada para cada analito. La selección de esta región espectral se realizó analizando la varianza de la calibración, con la estrategia de ventana móvil.²⁵ Para el norfloxacin 390-440, para el enoxacin 360-430 y para el ofloxacin de 460-540 nm. Se realizó validación cruzada para el conjunto de patrones de calibración, dando un número óptimo de factores de 4 de acuerdo con el criterio de Haaland y Thomas²⁶.

Con este modelo, la predicción para las muestras T1-T8 ando PLS-1, nos dan unos valores de recuperación bastante aceptables. Para el caso del enoxacin, los resultados son menos satisfactorios debido a que este analito es el menos sensible. Los resultados se muestran en la Tabla IV. 5.

Los datos tridimensionales de emisión-excitación para el conjunto de predicción T1-T8 fueron también analizados mediante n-PLS y PARAFAC, para este último modo utilizando el modo 2 (según Tabla IV. 4). Como se observa en la Tabla IV. 5., los resultados más aceptables para enoxacin son los obtenidos mediante nPLS, mientras que para los otros dos componentes, los resultados son similares.

²⁵ Collado, M.S.; Mantovani, V.E.; Goicoechea, H.C.; Olivieri, A.C. *Talanta* 52, 909, 2000

²⁶ Haaland, D.M.; Thomas, E.V. *Analytical Chemistry* 60, 1193, 1988

Tabla IV. 5.- Predicción en mezclas ternarias utilizando diferentes algoritmos para la calibración.

COMPUESTO	MÉTODO					
	PLS-1 ^a		nPLS ^b		PARAFAC ^b	
	REP /% ^c	Recuperación media ^d	REP /% ^c	Recuperación media ^c	REP /% ^c	Recuperación media ^d
Norfloxacin	6.98	98.3 (11)	6.09	98.0 (6)	6.81	102.6 (7)
Enoxacin	8.10	96.7 (9)	4.05	99.1 (4)	4.64	97.3(3)
Ofloxacin	5.57	97.1 (4)	5.05	98.6 (4)	6.41	97.3 (3)

^a Utilizando los espectros de emisión, y seleccionando las siguientes regiones espectrales: norfloxacin, 390-440 nm, enoxacin, 360-430 nm y ofloxacin, 460-540 nm.

^b Utilizando espectros de emisión-excitación, registrados en los siguientes rangos: emisión de 381 a 480, en intervalos de 3 nm, y excitando de 250 a 340 nm, en intervalos de 5 nm. Para el caso de PARAFAC, se ha empleado el modo 2, indicado en la Tabla IV.4.

^c REP = Error relativo de predicción.

^d Los valores entre paréntesis corresponden a las desviaciones estándar, correspondientes a las recuperaciones de las ocho muestras problemas.

Aplicación de PARAFAC al análisis de muestras de suero

Se prepararon un total de 18 muestras (S1-S18), conteniendo contenidos diferentes de los analitos objetos de estudio, en presencia de suero plasmático. A varias matrices se adicionó la cantidad adecuada de suero plasmático y de cada uno de los tres analitos. Una vez transcurrido un periodo de 30 minutos, con objeto de favorecer las posibles interacciones entre los analitos y el suero, se realizó una dilución (1:250), de manera que la concentración final de los analitos quedase dentro de los rangos de calibración. Además, las muestras tienen un contenido final de $1.2 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de SDS. La acidez del medio se fijó mediante la adición de tampón acético-acetato (pH=4.0; 0.2 mL).

En estas condiciones experimentales, se registraron los diferentes espectros, tanto de emisión a una excitación de 277 nm (para aplicar PLS), como los de emisión-excitación, para aplicar nPLS y PARAFAC. Utilizando los modelos optimizados anteriormente mediante PLS-1y nPLS (modelados con los espectros de emisión fluorescente, y emisión-excitación respectivamente), se observa la incapacidad de ambos para producir resultados aceptables en las muestras de suero S1-S18. Específicamente, son los errores de predicción (REP), los que presentan valores inaceptablemente elevados en todos los casos. Esto es debido a la presencia de componentes fluorescentes en el suero no modelados, ya que la influencia de estos posibles componentes no ha sido tomada en cuenta en la calibración. Estos compuestos fluorescentes del suero, no sólo presentan emisiones fluorescentes que solapan con las señales fluorescentes de los analitos, sino que además son intrínsecamente variables, presentando distinta composición para individuos diferentes, lo cual dificulta la modelación, a no ser que se emplee la *ventaja de segundo orden*, indicada anteriormente.

En la siguiente figura (Figura IV. 12) se comparan los espectros de dos muestras diferentes, una en ausencia de suero (A) y en la otra (B) en presencia de suero.

Hay que destacar la diferencia existente en la escala de la intensidad de fluorescencia. En la muestra (B) se observa que la intensidad es notablemente mayor. También se puede comprobar como la señal emitida por el suero solapa y oculta completamente con la producida por los analitos.

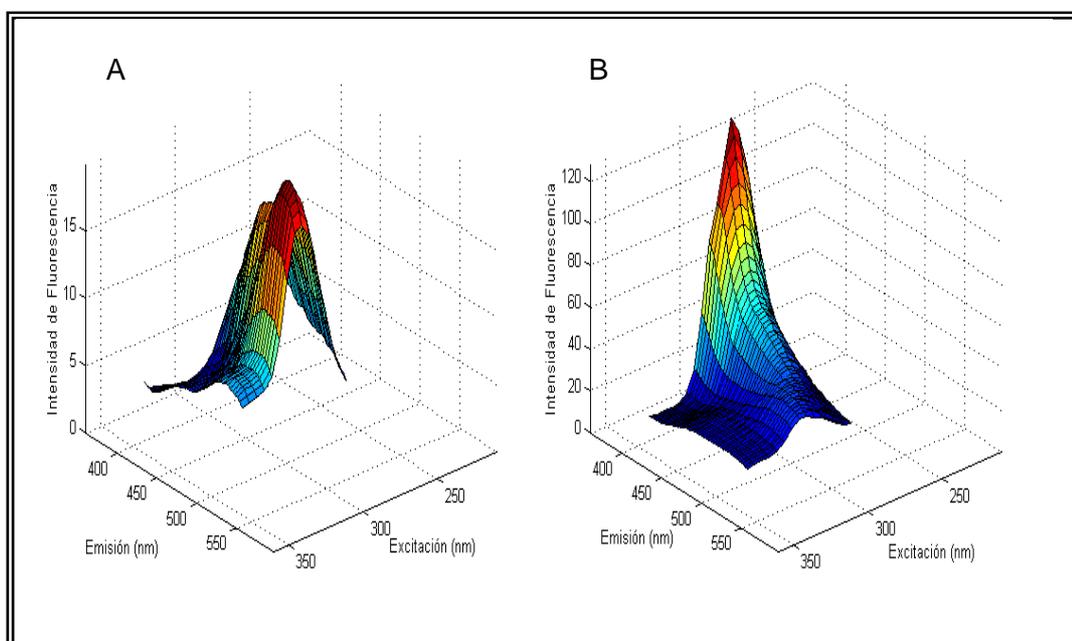


Figura IV. 12. Matriz de excitación emisión de una muestra conteniendo ENO, NOR y OFLO en ausencia (A) y en presencia (B) de suero.

Aunque nPLS es un modo muy eficiente, para llevar a cabo el análisis de datos tridimensionales, del mismo tipo a los utilizados en este trabajo; presenta el inconveniente de que en la calibración no se incluye la muestra incógnita; ya que la concentración de esta muestra incógnita no es conocida. Es por esto por lo que nPLS no proporciona información sobre las interferencias no calibradas, como es en este caso el suero.

Para aprovechar al máximo la *ventaja de segundo orden*, se ha aplicado de forma separada PARAFAC con un conjunto calibración formado por las señales de emisión-excitación fluorescente de los 15 patrones (C1-C15), junto con cada una de las muestras de suero (S1-S18). Los cubos de calibración formados, son para todos los casos de dimensiones 16x42x15 (*i.e. IxJxK*).

Selección del número de factores

Para llevar a cabo la selección del número óptimo de factores, se ha analizado el valor del denominado *core consistency*, así como el error de la regresión puesto/encontrado. En la siguiente figura (Figura IV. 13) a modo de ejemplo, se muestran los valores obtenidos para el *core consistency* y el error de las rectas de regresión puesto / encontrado para la calibración formada por los quince patrones de calibrado junto con una de las muestras de suero (S9).

Como podemos comprobar, el valor del *core consistency* cae a un valor muy bajo, cuando se utilizan cinco factores espectrales para modelar la calibración, de manera que el número de factores óptimos a utilizar es $N = 4$.

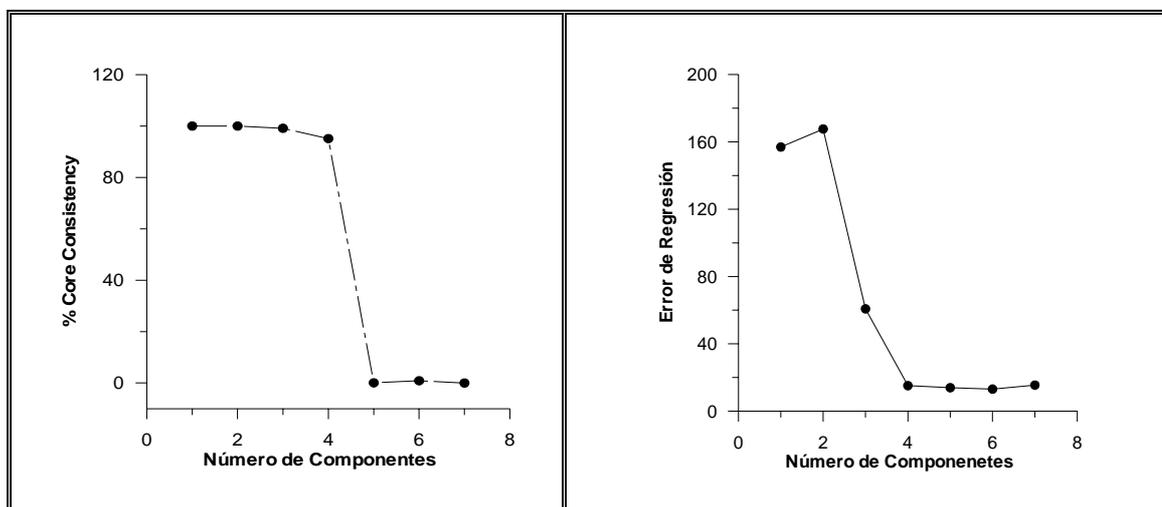


Figura IV. 13. Representación del valor del *core consistency* en función del número de componentes modelados (A), y del error de regresión para la relación puesto/encontrado sobre las muestras de calibración (B).

Además de utilizar el criterio descrito anteriormente, también podemos seleccionar el número óptimo de factores, analizando la variación en el error de regresión de la pseudo regresión univariante, en función del número de factores. Este método debe aplicarse para cada una de las muestras incógnitas. Como se puede ver en la figura anterior, para el caso de la muestra S9, el error de regresión para los tres analitos permanece constante cuando el número de factores es superior a cuatro, lo cual está de acuerdo con el análisis del *core consistency*.

Para el resto de muestras problemas, el número de factores sigue siendo cuatro. Lo cual indica que aunque las muestras de calibrado hayan sido hechas exclusivamente con los tres analitos puros, la presencia de suero introduce nuevos elementos fluorescentes al conjunto de datos, pero que PARAFAC los considera como un único componente extra, permitiendo así su modulación en muestras desconocidas de suero.

En la Figura IV. 14, podemos ver los perfiles de las matrices **B** y **C**, que se obtienen al procesar la muestra S9 junto con el conjunto de calibración, y tras aplicar PARAFAC. En esta figura, se han etiquetado los componentes de acuerdo con el orden asignado por el modelo, en este caso concreto. Los componentes aparecen en orden, en función a su contribución al total de la varianza. En nuestro caso, la interferencia del suero aparece en primer lugar, lo cual indica que es la principal fuente de fluorescencia. Seguidamente aparecen los demás componentes del cubo de datos.

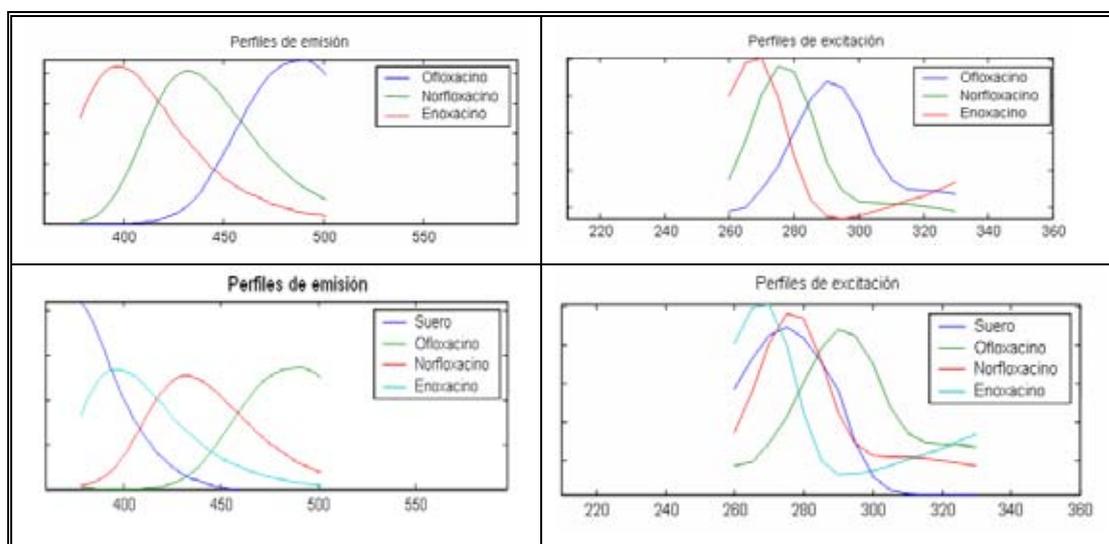


Figura IV. 14.- Perfiles de excitación de los factores optimizados: (A) muestras de suero en presencia de NOR, ENO y OFLO; (C) espectros de los patrones puros de ENO, OFLO y NOR. Perfil de emisión de los factores optimizados : (B) muestras de suero en presencia de NOR, ENO y OFLO; (D) espectros de los patrones puros de ENO, OFLO y NOR.

Si comparamos los espectros dados por PARAFAC, con los espectros de los componentes puros, podemos asignar que el número uno corresponde al suero, el número dos corresponde al ofloxacin, el número tres al norfloxacin y finalmente el número cuatro corresponde al enoxacin.

El hecho de que NOR (3) sea el componente que presenta una mayor semejanza en cuanto al perfil de emisión con el interferente (1), podría justificar el mayor valor de REP obtenido para ese componente.

En la Tabla IV. 6, se resumen los valores de concentración encontrados para los tres componentes en el conjunto de muestras de suero analizadas utilizando cuatro factores.

Los resultados estadísticos mostrados en la tabla IV. 6, presentan un valor de REP para los tres analitos comparables con los encontrados en las mezclas ternarias T1-T8. Este hecho es remarcable, ya que el análisis de componentes específicos en muestras de suero humano, normalmente requiere el empleo de conjuntos de calibración con numerosos patrones, cuando se utilizan señales espectrales unidimensionales. Para hacernos una idea comparativa, podemos citar tres determinaciones en las que se utiliza PLS-1, que requieren ochenta disoluciones diferentes de suero con teofilina, con detección espectrofotométrica UV-visible²⁷, cincuenta para tetraciclina utilizando emisión fluorescente²⁸, y más de cien para la determinación de glucosa mediante espectroscopia de infrarrojo cercano²⁹.

²⁷ Goicoechea, H.C.; Muñoz de la Peña, A.; Olivieri, A.C. *Analytical Chimica Acta*, 384, 95, 1999

²⁸ Goicoechea, H.C.; Olivieri, A.C. *Analytical Chemistry*, 71, 4361, 1999

²⁹ Zang, L.; Small, G.W.; Arnold, M.A. *Analytical Chemistry* 74, 4097, 2000

Tabla IV. 6. Resultados obtenidos cuando se aplica PARAFAC, para el análisis muestras de suero fortificadas con enoxacino, ofloxacino y norfloxacino.

Muestra	NORFLOXACINO ($\mu\text{g/L}$)		ENOXACINO ($\mu\text{g/L}$)		OFLOXACINO ($\mu\text{g/L}$)	
	Actual	Predicha ^a	Actual	Predicha ^a	Actual	Predicha ^a
S1	10.00	6.88 (0.05)	80.00	66.8 (0.9)	20.00	17.1 (0.1)
S2	10.00	7.98 (0.05)	120.00	114.9 (0.9)	35.00	30.1 (0.1)
S3	10.00	10.54 (0.05)	160.00	150.2 (0.9)	50.00	43.7 (0.1)
S4	0.00	0.20 (0.05)	200.00	178.5 (0.9)	65.00	64.1 (0.1)
S5	10.00	8.60 (0.05)	80.00	71.9 (0.9)	0.00	0.2 (0.1)
S6	14.00	11.45 (0.05)	80.00	70.4 (0.9)	0.00	0.3 (0.1)
S7	0.00	-0.34 (0.05)	80.00	69.8 (0.9)	0.00	-0.1 (0.1)
S8	10.00	6.97 (0.05)	120.00	115.7 (0.9)	20.00	16.2 (0.1)
S9	10.00	7.96 (0.05)	50.00	41.6 (0.9)	20.00	19.7 (0.1)
S10	10.00	10.94 (0.05)	350.00	340.9 (1.0)	20.00	21.2 (0.1)
S11	10.00	12.72 (0.05)	0.00	0.7 (1.0)	20.00	22.5 (0.1)
S12	20.00	17.10 (0.06)	0.00	-0.4 (1.0)	20.00	23.6 (0.1)
S13	12.00	11.85 (0.05)	0.00	1.0 (1.0)	20.00	23.0(0.19)
S14	12.00	9.92 (0.05)	0.00	-0.3 (1.0)	20.00	17.1(0.1)
S15	5.00	6.50 (0.05)	40.00	42.2 (1.0)	20.00	17.8 (0.1)
S16	20.00	15.67 (0.05)	48.00	35.4 (0.9)	20.00	23.0 (0.1)
S17	20.00	17.40 (0.05)	68.00	48.2 (0.9)	20.00	23.6 (0.1)
S18	5.00	5.00 (0.05)	60.00	61.4 (0.9)	20.00	18.7 (0.1)
Resultados estadísticos ^b						
RMSEP		2.17		9.9		2.9
REP		17.4		6.6		7.3

^a Desviación estándar entre paréntesis.

^b RMSEP= raíz cuadrada del error de predicción, REP%= error relativo de predicción.

El resultado de la descomposición del conjunto de datos, formado por las quince muestras de calibrado, más la muestra incógnita S9, es decir, los dieciséis valores de la matriz **A** se muestran en la Tabla IV. 7. Los resultados específicos dados por PARAFAC, muestran que los valores asignados a la interferencia son muy bajos para todas las muestras de calibrado, pero significativamente elevado en la muestra incógnita. Mientras que para el resto de analitos, en valor absoluto, los valores son considerables. Para cada analito, mediante la regresión lineal entre las concentraciones de los patrones de calibrado y la interpolación de su valor específico de *A* (concentración relativa), se obtienen los valores de concentración absolutos, mostrados en la Tabla IV. 6.

Tabla IV. 7.- Valores de concentración relativa para los cuatro componentes encontrados por PARAFAC en el cubo de datos, formado por la unión de la muestra problema S9 con las 15 muestras de calibrado C1-C15

MUESTRA	VALOR DE A			
	Suero	Ofloxacin	Norfloxacin	Enoxacin
C1	4.03	-116.61	-109.97	-95.67
C2	2.13	129.58	-84.28	-57.46
C3	4.25	-119.00	-95.00	58.31
C4	-2.70	112.90	-110.27	90.47
C5	-1.51	-114.27	91.46	-86.67
C6	-2.64	107.69	77.92	-83.41
C7	-3.25	-115.48	94.06	123.21
C8	-0.76	135.21	109.80	61.65
C9	1.65	-26.09	-181.06	4.42
C10	-3.24	14.07	181.89	-42.35
C11	-0.80	2.08	-10.22	-138.44
C12	4.67	8.50	15.30	152.63
C13	-1.28	-207.19	0.58	2.34
C14	-0.02	191.03	24.15	22.12
C15	-0.50	-2.41	-4.40	-11.13
S9	500.76	-103.53	-63.00	-103.75

Parámetros de calidad

Los parámetros de calidad, denominados en la bibliografía como figuras de mérito, son empleados normalmente y tienen gran utilidad para la comparación entre métodos.

La sensibilidad (SEN) para un analito en concreto, por ejemplo, se estima como la señal neta de ese analito en unidades de concentración. La selectividad (SEL) es calculada como la relación entre la sensibilidad y la señal total, tal y como sugiere Kalivas³⁰. Más interesante resulta el concepto de sensibilidad analítica, definido, con analogía con la calibración univariante, como la relación entre la sensibilidad y el ruido espectral:

$$\gamma = \text{SEN}/[\text{V}(\text{R})]^{1/2} \quad \text{Ecuación 27}$$

La inversa (γ^{-1}) establece la mínima diferencia en concentración, que puede ser apreciada por el método, teniendo en cuenta la técnica, el equipo y la escala empleada³¹. El término $\text{V}(\text{R})$ es la varianza de la señal instrumental, que se estima mediante la medida de réplicas del blanco.

Los errores estándares, en las concentraciones predichas $[\text{s}(\text{c})]$ han sido calculados según la representación pseudo-univariante proporcionada por PARAFAC (ver tabla IV. 4):^{32,33}

$$\text{s}(\text{c}) = [\text{SEN}^{-2} (1 + h)\text{V}(\text{R}) + h\text{V}(\text{c})]^{1/2} \quad \text{Ecuación 28}$$

³⁰ Messick, N. J.; Salivas, J. H.; Lang, P.M. *Analytical Chemistry* 68, 1572, 1996.

³¹ Cuadros Rodríguez, L.; García Campaña, A. M.; Jiménez Linares, C.; Román Ceba, M. *Analytical Letters* 26, 1243, 1993.

³² Boqué, R.; Ferré, J.; Faber, N.M.; Rius, F.X. *Analytical Chimica Acta*. 451, 313, 2002

³³ Feber, N.M.; Bro, R. *Chemometrics Intelligent Laboratory Systems*, 61, 133, 2002

donde $V(c)$ es la varianza en la medida de las concentraciones de los patrones de calibración. Finalmente el parámetro h es el nivel del analito, que nos indica lo alejado que está esa muestra del centro de la calibración, y es la misma que en los modelos clásicos de orden cero, es decir:

$$h = (c_{\text{unk}} - \bar{c}_{\text{cal}})^2 / \sum_{i=1}^1 (c_{\text{cal},i} - \bar{c}_{\text{cal}})^2 \quad \text{Ecuación 29}$$

donde c_{unk} es la concentración predicha para la muestra incógnita, $c_{\text{cal},i}$ es la concentración del i -ésimo patrón de calibrado y \bar{c}_{cal} es la media de las concentraciones de los patrones de calibrado. El cálculo de $s(c)$ nos permite calcular el límite de detección del método, como³⁴:

$$\text{LOD} = 3.3s(0) \quad \text{Ecuación 30}$$

donde $s(0)$ es la desviación estándar de la concentración predicha del analito de interés, en la muestra del blanco. Esto se calcula fijando $c_{\text{unk}} = 0$ en la

$$s(c) = \left[\text{SEN}^{-2} (1 + h)V(R) + hV(c) \right]^{\frac{1}{2}} \quad \text{Ecuación 31}$$

$$h = (c_{\text{unk}} - \bar{c}_{\text{cal}})^2 / \sum_{i=1}^1 (c_{\text{cal},i} - \bar{c}_{\text{cal}})^2 \quad \text{Ecuación 32}$$

³⁴ Boqué, R.; Ferré, J.; Faber, N.M.; Rius, F.X. *Analytical Chimica Acta*, 451, 313, 2001

Los valores de errores estándar en las concentraciones predichas, que aparecen en la Tabla IV. 6, se calcularon utilizando como valor auxiliar de $V(R)$ = 0.25 en unidades de fluorescencia al cuadrado, y $V(c)$ se estima del error de propagación en las concentraciones preparadas, ca. $1 \times 10^{-4} \mu\text{g}^2\text{L}^{-1}$, sensibilidades analíticas y levas de las muestras. Valores dentro del rango comprendido de 0.05 a $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$.

Otras figuras de mérito se recogen en la Tabla IV.7 . El analito que presenta menor sensibilidad y selectividad es el enoxacino, por lo que presenta un mayor límite de detección y γ^{-1} , con respecto a norfloxacino y ofloxacino.

Los resultados obtenidos, deben ser considerados como satisfactorios, si tenemos en cuenta la complejidad de las muestras estudiadas.

Tabla IV.7. Parámetros de calidad

FIGURA DE MÉRITO	NORFLOXACINO	ENOXACINO	OFLOXACINO
Sensibilidad (SEN)/ FU L μg^{-1}	9.7	0.6	4.4
Selectividad (SEL)	0.70	0.58	0.87
Sensibilidad Analítica (γ) / L μg^{-1}	20	1.1	10
$\gamma^{-1} / \mu\text{g L}^{-1}$	0.05	0.9	0.1
LOD / $\mu\text{g L}^{-1}$	0.2	3.0	0.5

Por otra parte, se pueden comparar ventajosamente con los límites de detección obtenidos con las técnicas de HPLC con detección UV-visible, que en suero se encuentran en el intervalo comprendido entre 20-100 $\mu\text{g/L}$.^{35,36}

La determinación simultánea de estas tres fluoroquinolonas en suero humano no es más que un ejemplo limitado del potencial de estos métodos en el campo del bioanálisis.

³⁵ Wallis, S.C.; Charles, B.G., Gahan, L.R.; *Journal of Chromatography B*, 674,306

³⁶ Carlucci, G.; *Journal of Chromatography A.*, 812, 343, 1998

Capítulo V.

**Efectos de la irradiación UV en las características
luminiscentes de enoxacino, norfloxacino, ofloxacino,
ciprofloxacino y enrofloxacino.**

1. Introducción

En los capítulos anteriores hemos hecho referencia a los principales datos bibliográficos sobre investigaciones recientemente llevadas a cabo en el análisis de fluoroquinolonas, además de incorporar los datos referentes a sus características analíticas, siendo una de las principales su fotolabilidad.

Es conocido que las fluoroquinolonas sufren procesos de degradación cuando se someten a irradiación UV e incluso, en algunos casos, cuando son afectadas por la luz natural. Dependiendo de las condiciones medioambientales y químicas, así como de las instrumentales de irradiación, se generan distintos fotoproductos.

En la bibliografía se encuentran varios trabajos relacionados con estudios de fotodegradación de fluoroquinolonas, pero son muy escasas las aplicaciones de dicha metodología al análisis de estos principios activos.

Así, se han realizado estudios sobre la fotodegradación del ciprofloxacino en disolución acuosa mediante HPLC de pares iónicos¹. La irradiación continuada, durante cuatro horas, en diferentes medios ácidos generados por la adición de HCl (0.001 M; 0.01 M y 0.1 M) y buffer fosfatos (pH= 3.1), genera un producto mayoritario y diversos productos minoritarios.

¹ Tornaiainen, T.; Maki, E., *Journal of Chromatography A*, 697, 397, 1995.

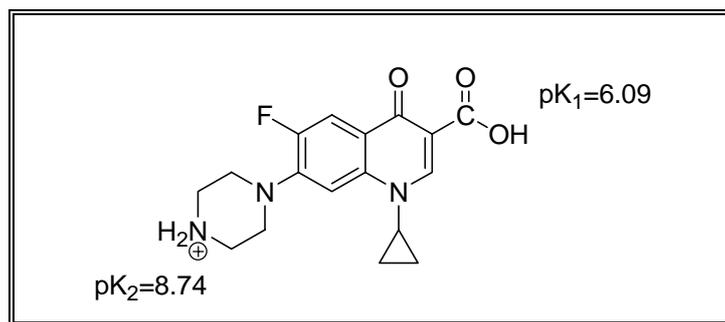


Figura V. 1.- Estructura del ciprofloxacino (CIPRO)

El principal producto de la fotodescomposición presenta las características ácido base del grupo carboxílico en la molécula original, lo cuál hace pensar en la desaparición del grupo piperazínico responsable de una posible segunda ionización en la molécula original. La reacción presenta una baja velocidad siendo necesario irradiar durante 240 minutos para reducir la señal del CP al 40% de la original.

Posteriores estudios² ponen de manifiesto que tanto el pH como la concentración afectan al rendimiento de la reacción. Así, se afirma que CP es más sensible a la irradiación en medios ligeramente básicos, es decir, es la forma neutra (zwitteriónica) la que actúa como generadora del fotoproducto. En dicho trabajo se propone como producto mayoritario de la fotodegradación al ácido 7-amino-1-ciclopropil-6-fluoro-1,4-dihidro-4-oxo-3-ona carboxílico (compuesto II, Figura V.2).

² Torniainen, K., Tammilehto, S., Ulvi, V., Int. *Journal of Pharmaceutics*, 132, 53, 1996.

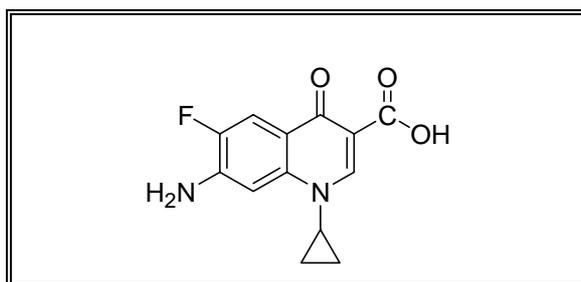


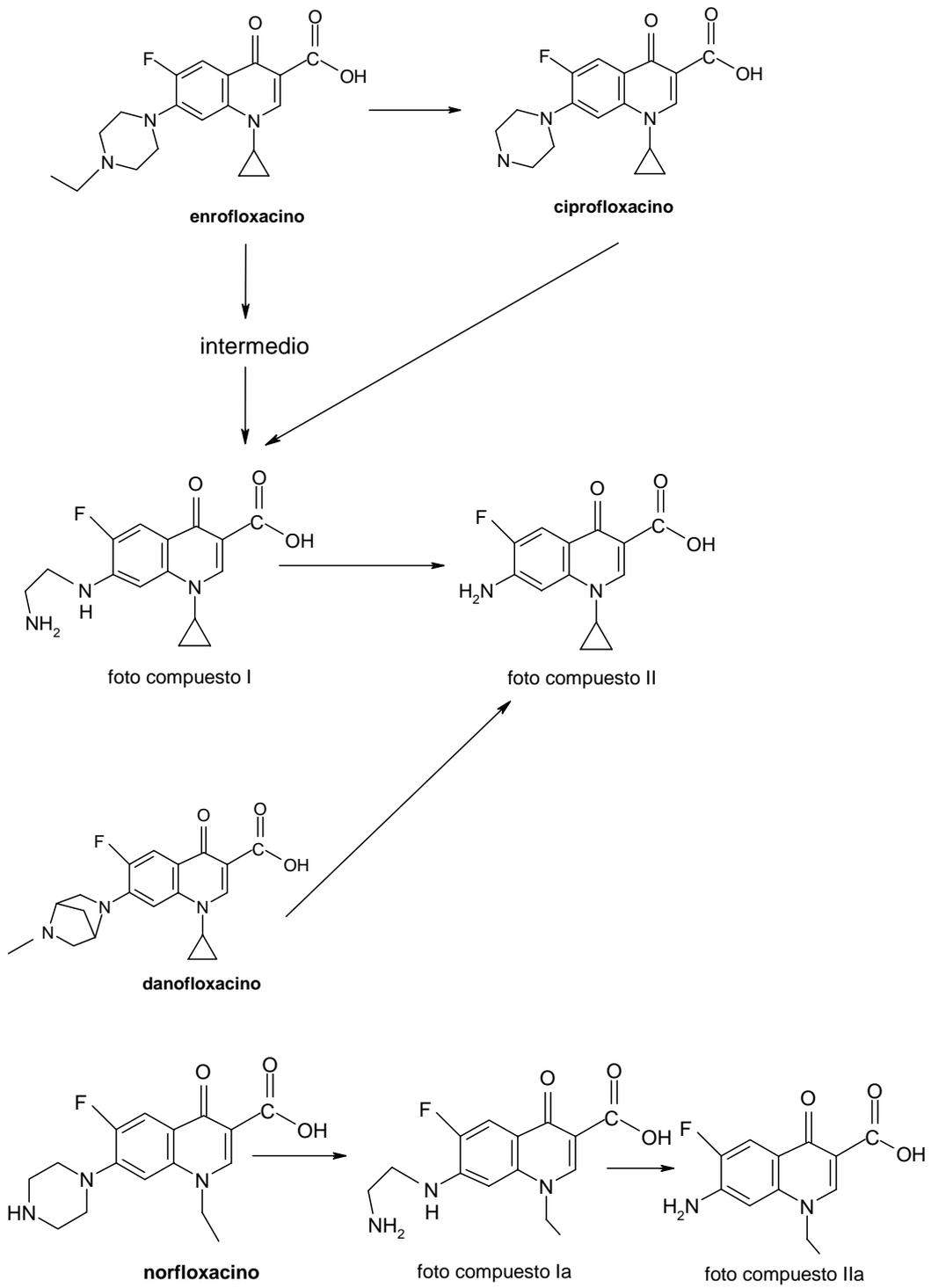
Figura V. 2.- Compuesto II

Adicionalmente se han realizado estudios de RMN-C13 y se ha aislado el producto en mezcla etanol agua³. La reacción que dicho producto forma con dimetilamino benzaldehido y los datos de espectroscopia IR parece poner de manifiesto efectivamente la presencia del grupo NH₂-aromático.

En las mismas fechas, otro equipo de investigación⁴ realiza de forma paralela estudios sobre la fotodegradación de varias fluoroquinolonas, concretamente enrofloxacin, ciprofloxacino, norfloxacin y danofloxacin. Los fotoproductos obtenidos previa irradiación se estudian mediante HPLC y espectroscopia de masas, proponiéndose una amplia ruta de productos de degradación para los cuatro analitos de interés. Las muestra irradiadas contenían 10 ppm de cada fluoroquinolona en agua. La irradiación fue llevada a cabo con lámpara de Xe (200 W/m²) durante tiempos muy elevados que oscilaban entre 0 y 100 horas o más. A continuación, se resumen los fotoproductos mayoritariamente formados.

³ Torniainen, K., Mattinen, J., Askolin, C.P., Tammilehto, S., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 15, 887, 1997.

⁴ Burhenne, J., Ludwig, M., Nikoloudis, P., Spitteller, M., *Environmental Science and Pollution Research*, 4,10,1997.



Para las cuatro fluoroquinolonas estudiadas se produce la alteración del anillo piperazínico dando lugar al derivado amino aromático. También se ha demostrado la generación de CO₂ como último producto en una degradación total, proponiéndose a partir de las 70 horas de exposición la fotomineralización total⁵.

Recientemente, Córdoba y col⁶ han estudiado la fotodegradación del norfloxacin estableciendo sus propiedades fluorescentes. Exponen que el norfloxacin es fotolabil en medio ácido y que dicha reacción altera las propiedades fluorescentes del analito. Posteriormente, estos autores proponen un método mediante HPLC para la determinación de NOR previa irradiación UV. Se lleva a cabo una detección UV a 278 nm, y utilizando un tampón fosfatos (pH= 3.0) y acetonitrilo (85:15) como fase movil. Ponen de manifiesto la influencia del excipiente en la estabilidad del norfloxacin en tabletas.

Mediante las técnicas de electroforesis capilar CZE y MEKC se han llevado asimismo a cabo el desarrollo de procedimientos de análisis de fluoroquinolonas, estudiándose la influencia de las sustancias húmicas en la fotodegradación de estos analitos en medio acuoso⁷.

Así, electroforesis capilar se ha aplicado a la realización del seguimiento de la fotolabilidad de enrofloxacin en presencia de ácidos húmicos por acción de la luz solar. Se observa como disminuye la fotólisis en presencia de estos compuestos. Cuando las disoluciones se irradian, la presencia de ácidos húmicos altera los fotoproductos formados, que tienden a adsorberse sobre dichos ácidos. En dicho trabajo se calculan los valores de pK para diversas quinolonas, así como para sus principales productos de degradación.

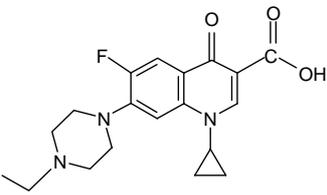
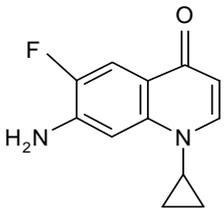
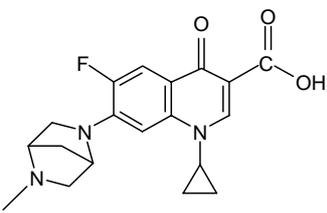
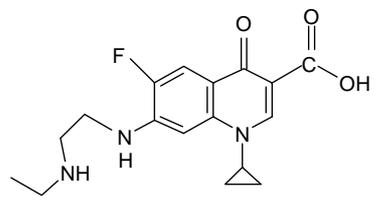
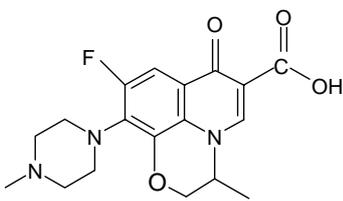
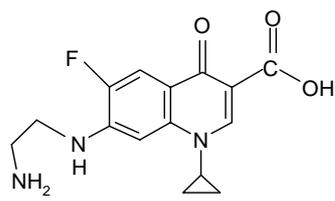
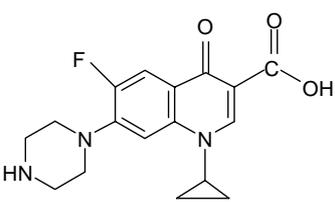
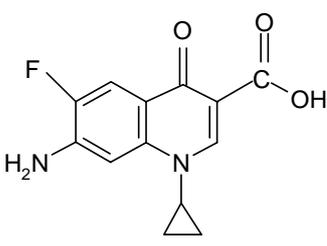
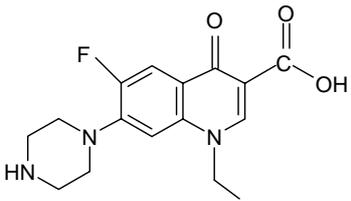
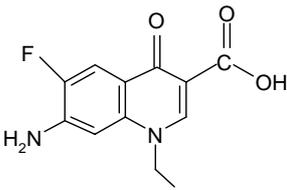
En la siguiente tabla reunimos aquellos correspondientes a los más relevantes.

⁵ Ibid, 4(2), 61, 1997.

⁶ Córdoba, M., Córdoba, M., Córdoba, D., *Journal of Pharmaceutical and Biomed. Analysis*, 18, 865, 1998.

⁷ Schimtt-Kopplin, Ph., Burhenne, J., Freitag, D., Spitteller, M., Kettrup, A., *Journal of Chromatography A*, 837, 253, 1999.

Tabla V. 1.- Fotoproductos descritos para diferentes quinolonas

Fluoroquinolona	pK _a	Producto de degradación	pK _a
Enrofloxacinó 	6.21 -COOH 7.74 + —NH— 		-----
Danofloxacinó 	6.21 -COOH 8.14 + —NH— 		6.20 -COOH 10.93 + —NH ₂ —
Ofloxacinó 	5.97 -COOH 7.65 + —NH— 		6.17 -COOH 10.18 + —NH ₃ —
Ciprofloxacinó 	6.27 -COOH 8.87 + —NH ₂ —		6.20 -COOH
Norfloxacinó 	6.26 -COOH 8.85 + —NH ₂ —		6.20 -COOH

Recientemente, Barbosa y col⁸ han evaluado, mediante métodos electroforéticos, cromatográficos, potenciométricos y absorciométricos, los valores de pK de diversas quinolonas en medios hidroorgánicos. Concretamente, se determinaron en medios acetonitrilo –agua, en diversas proporciones.

En la siguiente tabla podemos observar los valores de pK calculados para las fluoroquinolonas anteriormente mencionadas por varios métodos.

Tabla V. 2. Valores de pK calculados para diferentes fluoroquinolonas

Analito	Contenido en acetonitrilo									
	0 %		10 %		25 %		50 %		70 %	
OFLO	---	8.11 ^a	---	8.17 ^a	---	8.13 ^a	----	8.76 ^a	---	9.87 ^a
					6.10	7.99 ^d				
NOR	6.22 ^a	8.38 ^a	6.57 ^a	8.48 ^a	7.20 ^a	8.78 ^a	7.98 ^a	9.05 ^a	---	10.01 ^a
	5.94 ^b	8.22 ^b	6.17 ^b	8.29 ^b	6.27 ^c	8.35 ^c	-----	-----	-----	-----
ENO	6.00 ^a	8.50 ^a	-----	8.51 ^a	6.28 ^c	8.28 ^c	----	8.95 ^a	----	9.81 ^b
CIPRO	6.09 ^a	8.62 ^a	6.10 ^b	8.38 ^a	-----	-----	-----	8.95 ^a	----	9.84 ^b
	5.86 ^d	8.24 ^e	-----	8.30 ^d	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ENRO	5.88 ^d	7.74 ^d	6.12 ^d	7.89 ^d						
	6.06 ^b	7.70 ^b	-----	-----						
DANO	6.07 ^d	8.56 ^d	6.04 ^d	8.64 ^d	-----	-----	-----	-----	-----	-----

a. Valores potenciométricos; b. Valores UV visible; c. Valores cromatográficos; d. Valores electroforéticos.

⁸ Barbosa, J., Barron, D., Cano, J., Jiménez-Lozano, E., Sanz-Nebot, V., Toro, I., *Jornal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 24, 1087, 2001.

Creemos estos datos de utilidad a la hora de establecer comparaciones entre los pK de los posibles productos de degradación y las fluoroquinolonas originales.

También se encuentran referencias en cuanto a la determinación de los pK para diferentes fluoroquinolonas mediante fluorescencia, que se resumen en la siguiente tabla.

Tabla V. 3. Valores de pK calculados para CIPRO, NOR y OFLO

Fluoroquinolona	pK ₁	pK ₂	REF.
CIPRO	6.10	8.70	⁹
	5.90	8.89	¹⁰
NOR	6.40	8.45	⁹
	6.36	8.62	¹⁰
OFLO	5.97	8.28	¹⁰

Pretendemos en este capítulo resumir los resultados obtenidos en los estudios de fotirradiación de las cinco fluoroquinolonas de interés, enoxacino, norfloxacino, ofloxacino, ciprofloxacino y norfloxacino. Los estudios tienen como objetivo establecer las condiciones óptimas instrumentales y químicas de generación de los correspondientes fotoproductos, con el fin de estudiar la viabilidad de su utilización como metodología analítica para la determinación simultánea de dichas fluoroquinolonas con una elevada sensibilidad.

⁹ Huang, Z., Huang, H., Cai, R., Lin, Z., Korenaga, T., Zeng, Y., *Analytical Science*, 13, 1997.

¹⁰ A. I. Drakopoulos, P.C. Loannou, *Analytical Chimica Acta*, 354, 197, 1997.

2. Experimental

2.1 Efectos de la irradiación UV en las características luminiscentes del enoxacino.

Se realizaron estudios encaminados a establecer el comportamiento luminiscente de enoxacino cuando es irradiado mediante una fuente UV. Para la irradiación de las muestras se utilizaron cubetas fluorimétricas convencionales de 3 mL y cubetas de cuarzo de 10 mL, agitadas mediante un agitador magnético de forma continua. Inicialmente, se prepararon muestras conteniendo 0.1 µg/mL de enoxacino en agua y en mezclas etanol-agua. El potencial del detector se fijó a 750 V y las rendijas de emisión y excitación a 8 nm.

Influencia de la composición del disolvente

Teniendo en cuenta los estudios realizados previamente, referidos en el Capítulo II, se procedió a estudiar el efecto que produce la composición del disolvente sobre la fluorescencia, ensayando diferentes proporciones de etanol agua. Inicialmente, se irradiaron las muestras durante un tiempo constante (15 minutos) y se estableció la variación que sufre la intensidad de fluorescencia (Figura V. 3). Se fija el máximo de emisión a 405 nm, que coincide con el máximo de emisión para enoxacino. Se puede comprobar como, a medida que se incrementa el porcentaje de la fracción alcohólica en la mezcla disolvente, se produce un incremento en la fluorescencia, llegando a una zona constante, (30-65 %) a partir de la cual la fluorescencia vuelve a decaer.

De los resultados anteriores se deduce la gran influencia del contenido etanólico en las muestras. Por ello, y para analizar como influye el tiempo de irradiación se hizo un seguimiento de la variación de la fluorescencia con el tiempo de irradiación, para diferentes porcentajes de etanol-agua.

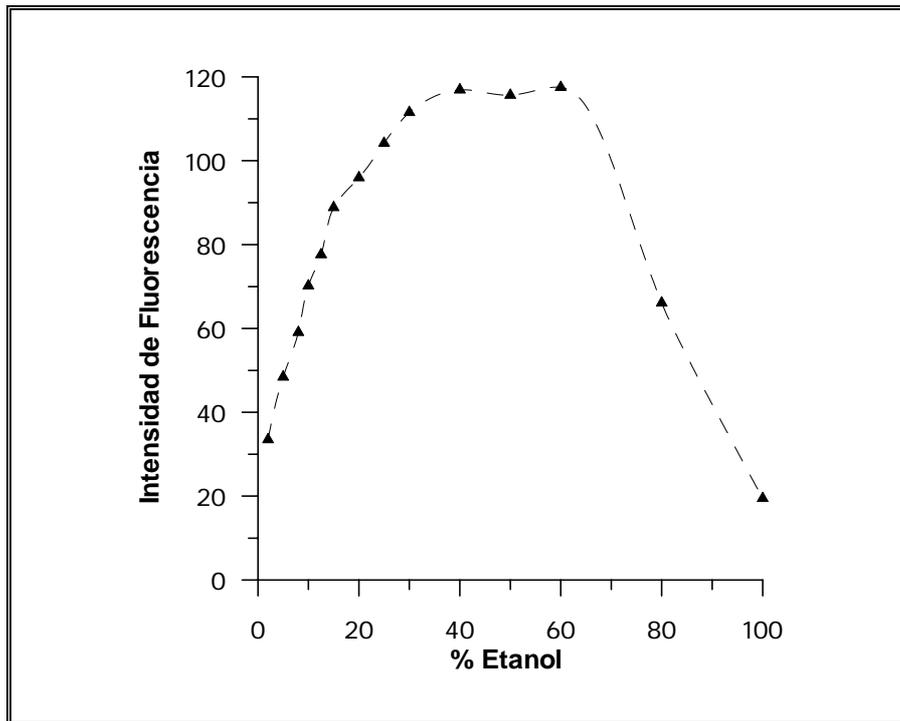


Figura V. 3. Variación de la intensidad de fluorescencia, en muestras de enoxacino irradiadas durante 15 minutos para diferentes proporciones etanol-agua.

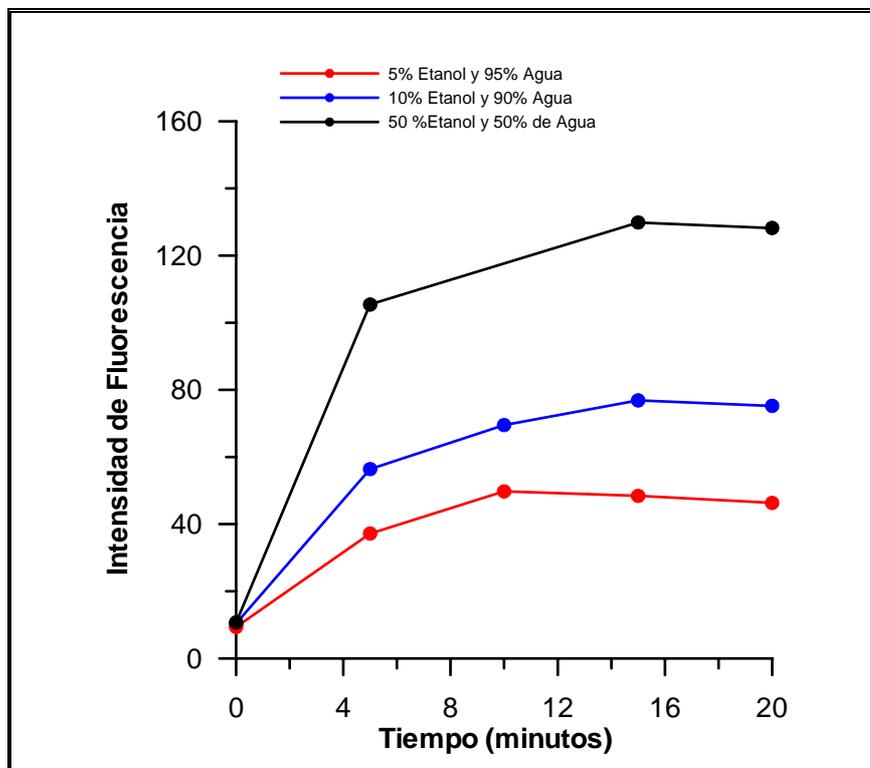


Figura V. 4. Variación de la intensidad de fluorescencia con el tiempo de irradiación para enoxacino en diferentes proporciones de etanol-agua.

Podemos observar (Figura V. 4) que a medida que se incrementa el tiempo de exposición de la muestra a la irradiación, se produce un aumento de la fluorescencia, siendo este aumento mayor a medida que el contenido en etanol aumenta. Pero, sin embargo, pudimos comprobar que se requieren tiempos elevados para alcanzar el equilibrio a medida que aumenta el contenido en etanol. Así, cuando la irradiación se efectúa en muestras que contienen 100 % de etanol, no se alcanza el equilibrio en un tiempo razonable (<20 minutos).

Con la irradiación no sólo se produce un incremento muy notable en la fluorescencia de la especie, sino que además se produce una modificación en la morfología de los correspondientes espectros. En la Figura V. 5 se han representado los correspondientes espectros de excitación y emisión para el enoxacino cuando la composición del disolvente es del 50% etanol/agua, irradiando 10 minutos y sin irradiar. Se puede observar como se produce un ligero desplazamiento del máximo de emisión fluorescente situado a 395 nm hacia longitudes de onda mayores, localizándose a 405 nm en la muestra irradiada.

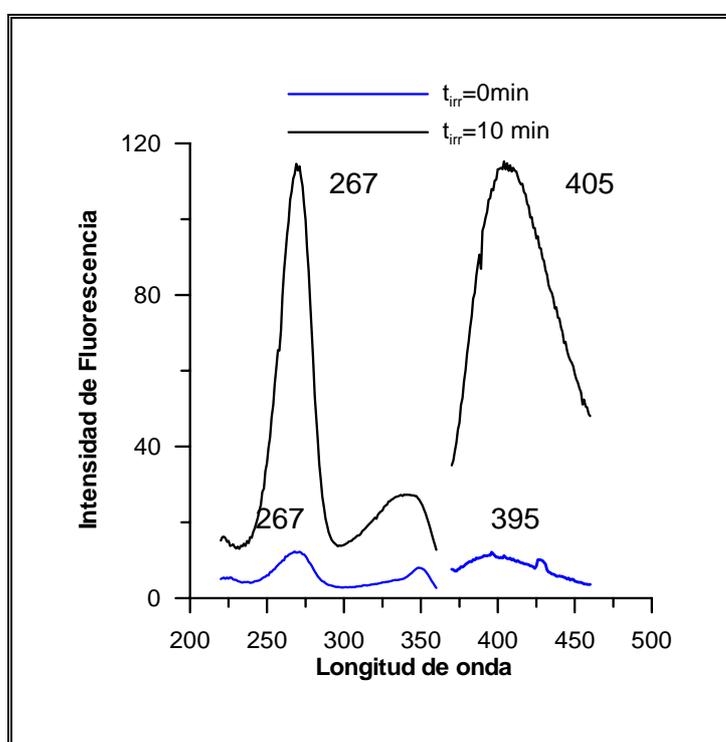


Figura V. 5.-Espectros de excitación-emisión para el enoxacino, en muestras sin irradiar y tras 10 minutos de irradiación.

Influencia de la presencia de peróxido de hidrógeno

Se ha observado en las experiencias anteriores (Capítulo II), que al someter la muestra a irradiación, se produce un incremento importante en la fluorescencia de la misma. Sin embargo, se requiere irradiar durante un tiempo prolongado para conseguir la estabilidad. Para intentar acelerar este proceso, se ha estudiado el efecto que puede ejercer la presencia de peróxido de hidrógeno, ya que esta molécula está frecuentemente involucrada en reacciones de generación de luminiscencia por diversos mecanismos.

En primer lugar, se llevó a cabo la elección de la concentración de peróxido adecuada. Para ello, se irradió durante sólo tres minutos, y se registraron los correspondientes espectros de emisión. En la Figura V. 6 se observa como evoluciona la intensidad de fluorescencia en función de la concentración de peróxido.

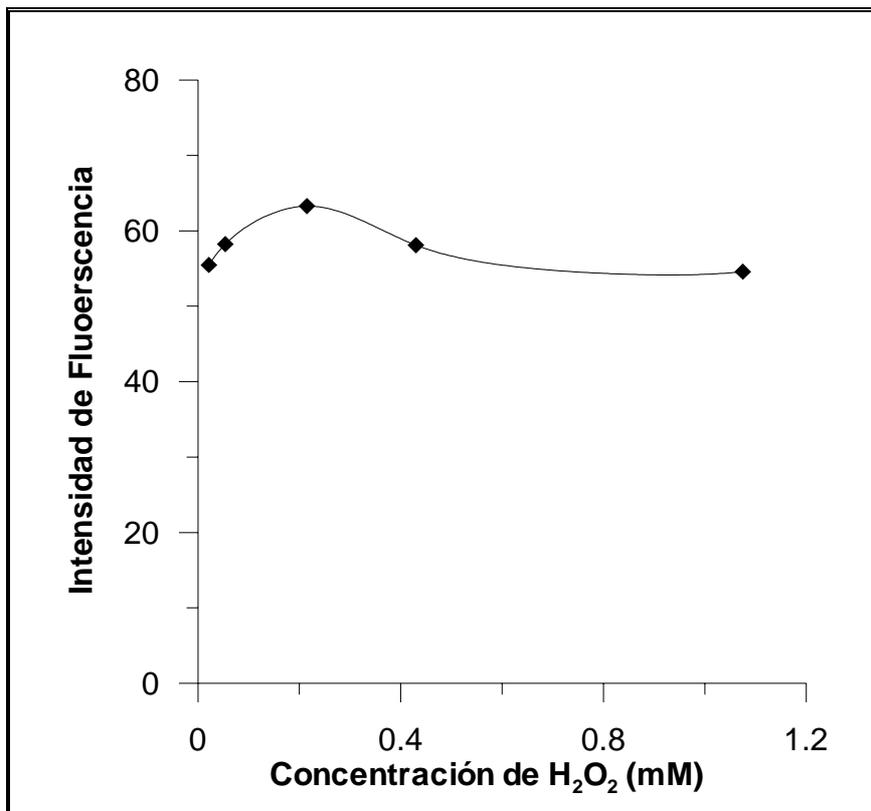


Figura V. 6 Variación de la intensidad de fluorescencia para enoxacino al modificar la concentración de peróxido de hidrógeno.

Se puede observar como aumenta ligeramente la intensidad de fluorescencia, y que a partir de una concentración de peróxido superior a 0.4 mM, la intensidad de la fluorescencia emitida por el analito se mantiene constante; por lo que, inicialmente se fija una concentración de peróxido de 0.43 mM para llevar a cabo estudios adicionales.

Una vez fijado este parámetro, se estudió la influencia de la composición del disolvente. En la Figura V. 7 podemos ver como se produce una variación en la intensidad de fluorescencia, en función de la composición del disolvente. El comportamiento que se observa es similar al producido en ausencia de peróxido (ver Figura V. 3). La proporción de 50% etanol se considera adecuado para realizar los posteriores estudios.

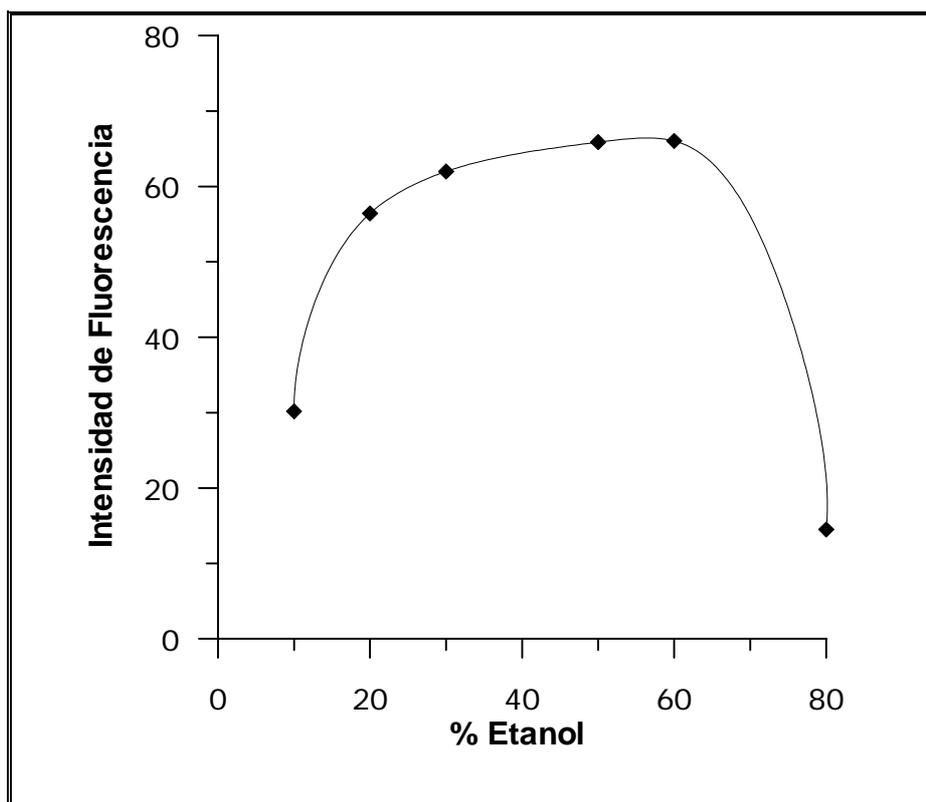


Figura V. 7.- Variación de la intensidad de fluorescencia de enoxacino, al modificar la proporción en etanol en las muestras para una concentración fija de peróxido de hidrógeno de 0.43 mM.

Finalmente, se evalúa la influencia que ejerce el tiempo de irradiación sobre la obtención del fotoproducto en las condiciones mencionadas, para dos concentraciones diferentes de peróxido de hidrógeno, 0.43 y 2.14 mM. Como se puede observar en la Figura V. 8 en presencia de peróxido se requiere un tiempo de sólo dos minutos para alcanzar la estabilidad en la fluorescencia del fotoproducto, pero sin embargo, las intensidades obtenidas son menores que aquellas que se obtienen en medio hidro etanólico en ausencia de H_2O_2 . La modificación de los espectros de excitación emisión con respecto a la muestra no irradiada, tal y como podemos ver en la Figura V.8, es similar a la obtenida en ausencia de peróxido de hidrógeno.

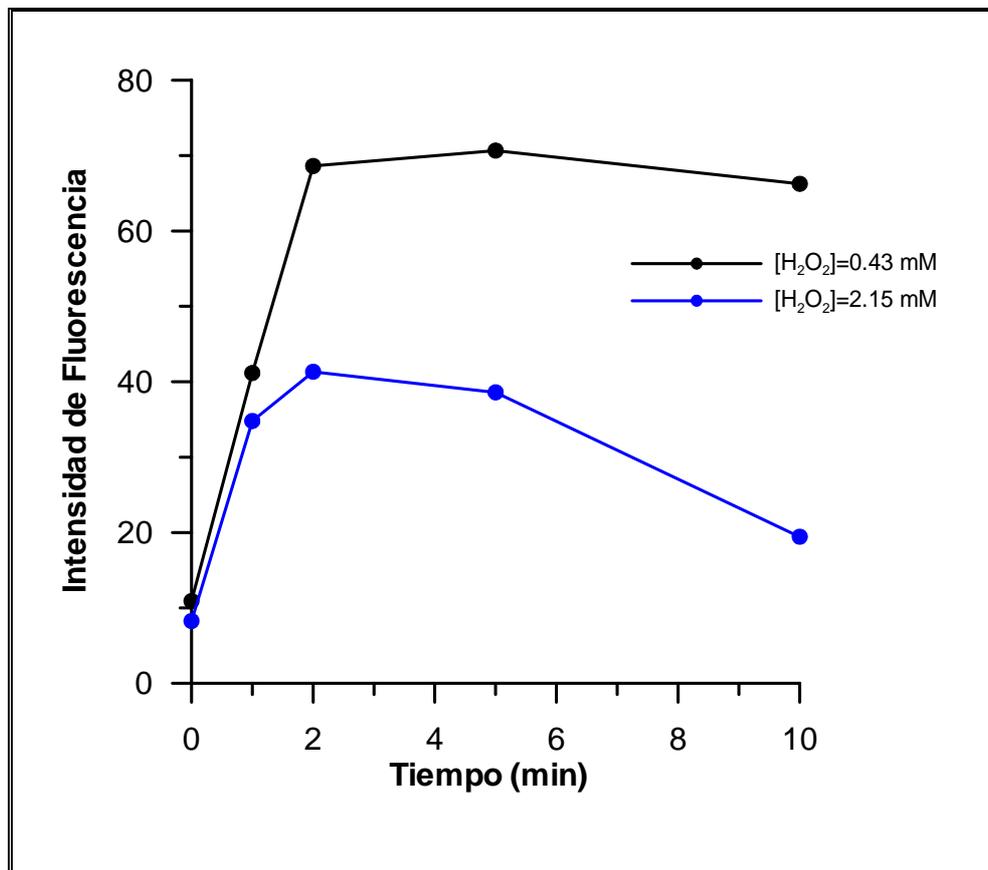


Figura V. 8. Variación de la intensidad de fluorescencia con el tiempo de irradiación, en presencia de peróxido de hidrógeno.

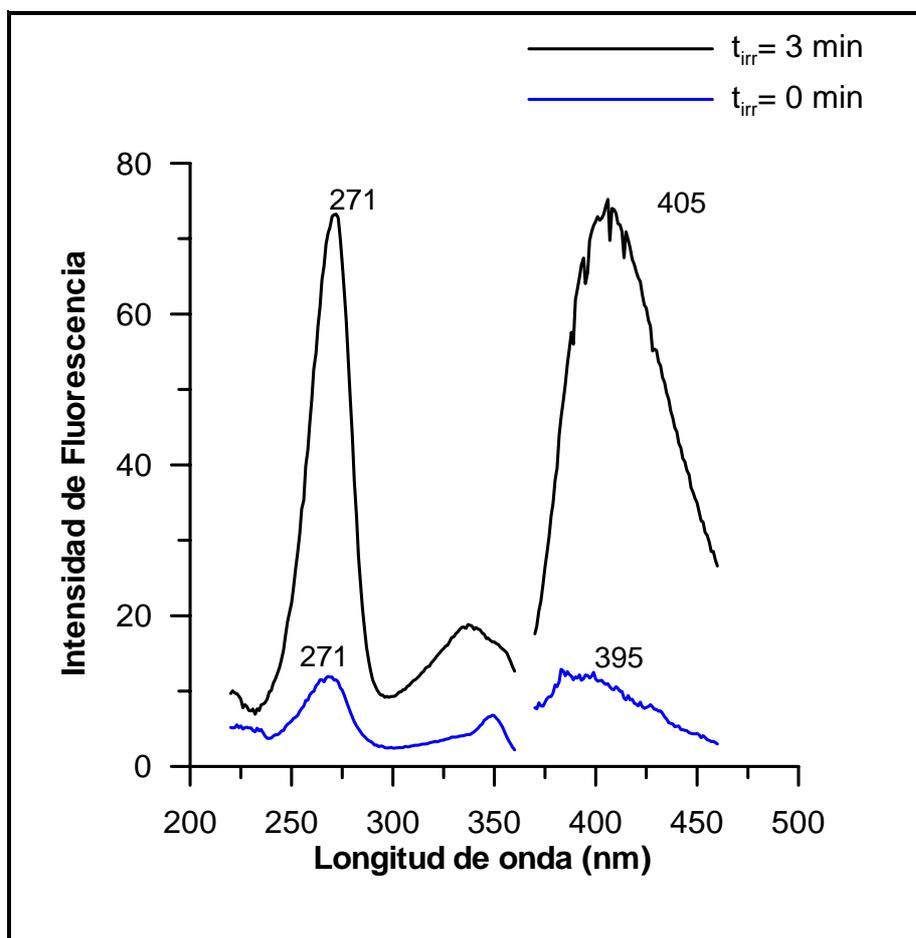


Figura V. 9. Espectros de emisión y excitación de enoxacino, antes y después de ser irradiado, en presencia de peróxido de hidrógeno.

Podemos comprobar que los espectros del fotoproducto, en presencia y en ausencia de peróxido de hidrógeno, son similares. Así en principio, el efecto del peróxido de hidrógeno parece afectar solo a la velocidad de formación del fotoproducto, aunque disminuyendo su rendimiento, lo que podría indicar la presencia de una reacción secundaria competitiva que se favorece para concentraciones elevadas de peróxido de hidrógeno.

Finalmente, se estudió el comportamiento que tiene el enoxacino al ser irradiado externamente en presencia de un agente tensoactivo. Para ello, se introdujo en la disolución de enoxacino como agente tensoactivo dodecil sulfato sódico (SDS), en una concentración 12 mM, realizándose el correspondiente estudio de la influencia en la fluorescencia con el tiempo de irradiación. Se observa que la presencia de un agente micelar incrementa la señal fluorescente en mayor medida que lo hace el peróxido, tal y como podemos ver en la Figura V.10.

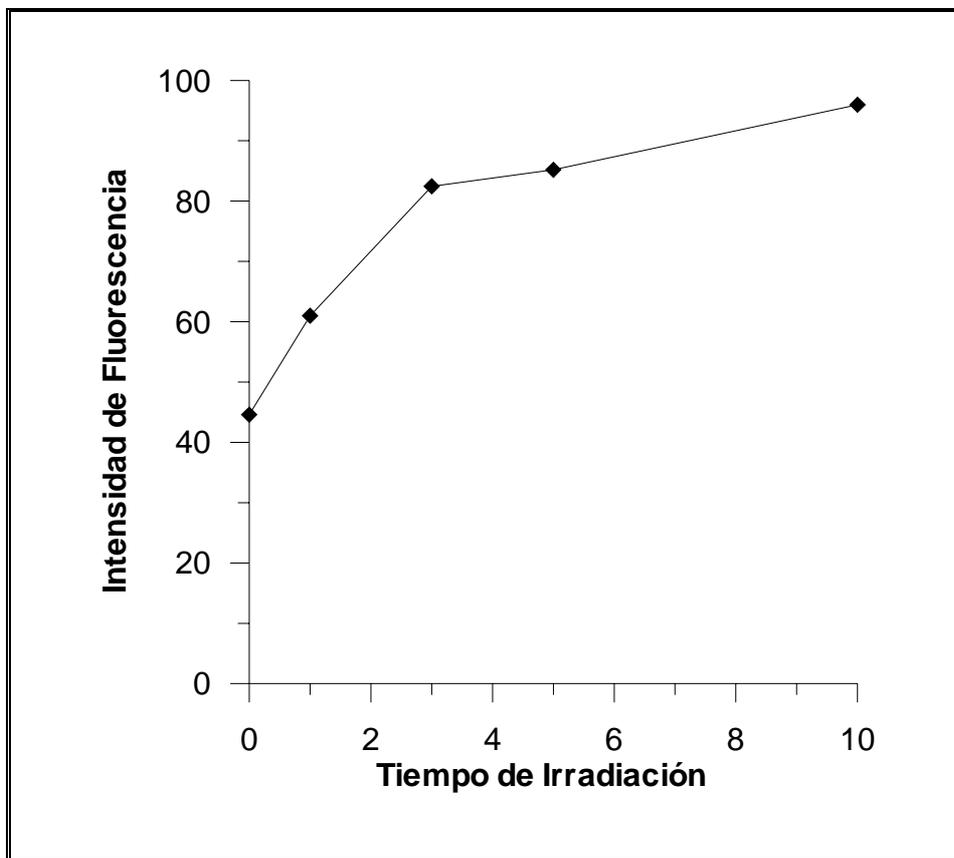


Figura V. 10. Variación de la intensidad de fluorescencia en presencia de un agente tensoactivo irradiando diferentes tiempos.

La presencia de peróxido de hidrógeno, en estas disoluciones que contienen un medio organizado no afecta a la fluorescencia del compuesto. El orden para establecer el medio organizado, antes o después de irradiar, es indiferente.

Influencia de la acidez del medio en el proceso de irradiación del enoxacin.

En estudios preliminares, se comprobó que la acidez del medio provoca cambios en la fluorescencia del analito, y en el Capítulo II se establecieron unos valores de pK_1 de 6.04 y de pK_2 de 9.53 en agua.

También en estudios preliminares se estableció que la molécula de enoxacin presenta notables cambios en sus propiedades fluorescentes cuando es irradiada con luz UV, lo cual podría implicar notables modificaciones en su estructura.

En las condiciones anteriormente indicadas, óptimas para la obtención del fotoproducto conteniendo un 50% de etanol, se procedió a estudiar como influye la acidez aparente del medio en la formación del fotoproducto derivado del enoxacin. Para ello, a muestras conteniendo 100 ng/mL de enoxacin se les modificó el pH por adición de volúmenes variables de ácido clorhídrico e hidróxido sódico de concentraciones adecuadas y, una vez alcanzado el pH aparente deseado fueron irradiadas durante 5 minutos obteniéndose los espectros de las muestras antes y después de ser irradiadas.

En la Figura V. 11 se representa la variación de la intensidad de fluorescencia con el pH del medio y, como se puede observar, a partir de pH 5 se observa un notable incremento de la señal de fluorescencia que se hace máxima para valores próximos a 6 y disminuye drásticamente para pH superiores. En dicha figura también se ha representado la variación de la intensidad de fluorescencia con el pH para las mismas muestras antes de la irradiación.

Según los resultados obtenidos, la zona óptima de pH para generar el fotoproducto a partir de enoxacino, en medio etanol agua, es próxima a 6.

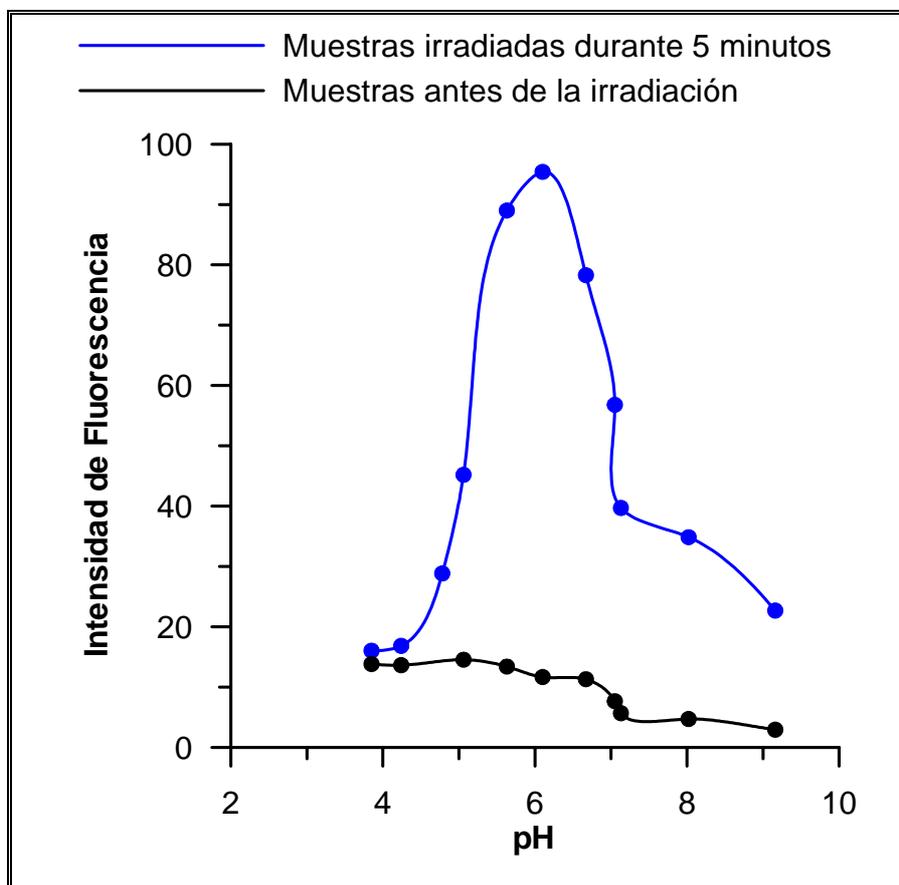


Figura V. 11.- Variación de la intensidad de fluorescencia para muestras irradiadas y sin irradiar a diferentes valores de pH.

En la Figura V.12. podemos observar los espectros de excitación y emisión de las muestras irradiadas durante cinco minutos; a pH 6, 10 y 4.

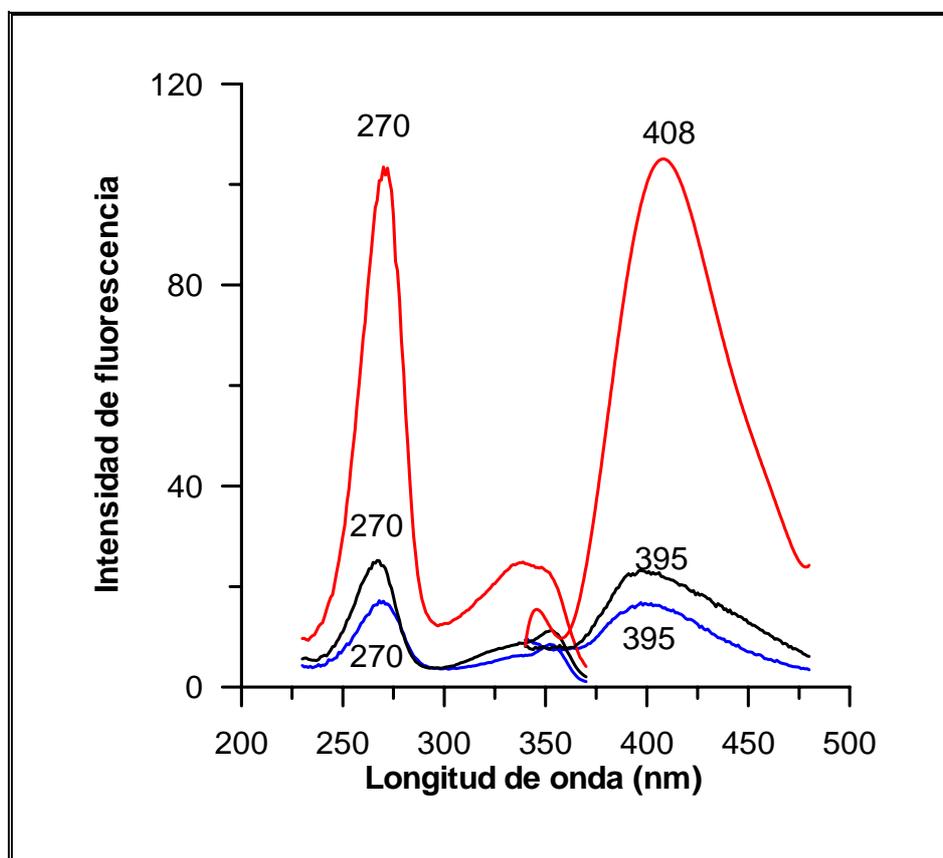


Figura V. 12.- Espectros de excitación y de emisión de las muestras irradiadas a pH = 6 (—), pH = 4 (—) y pH = 10 (—)

Como podemos observar es a pH próximos a la neutralidad, donde se obtiene mayor fluorescencia. Si comparamos estos espectros, con los que se obtienen cuando la muestra no es irradiada (Figura V. 13), podemos ver como no sólo se produce un incremento importante de la fluorescencia, aproximadamente 10 veces mayor, sino que además se produce una modificación en la morfología del mismo, observándose un desplazamiento batocrómico de la λ_{em} desde 395 hasta 408 nm. Dicho desplazamiento es similar al obtenido en presencia de peróxido de hidrógeno.

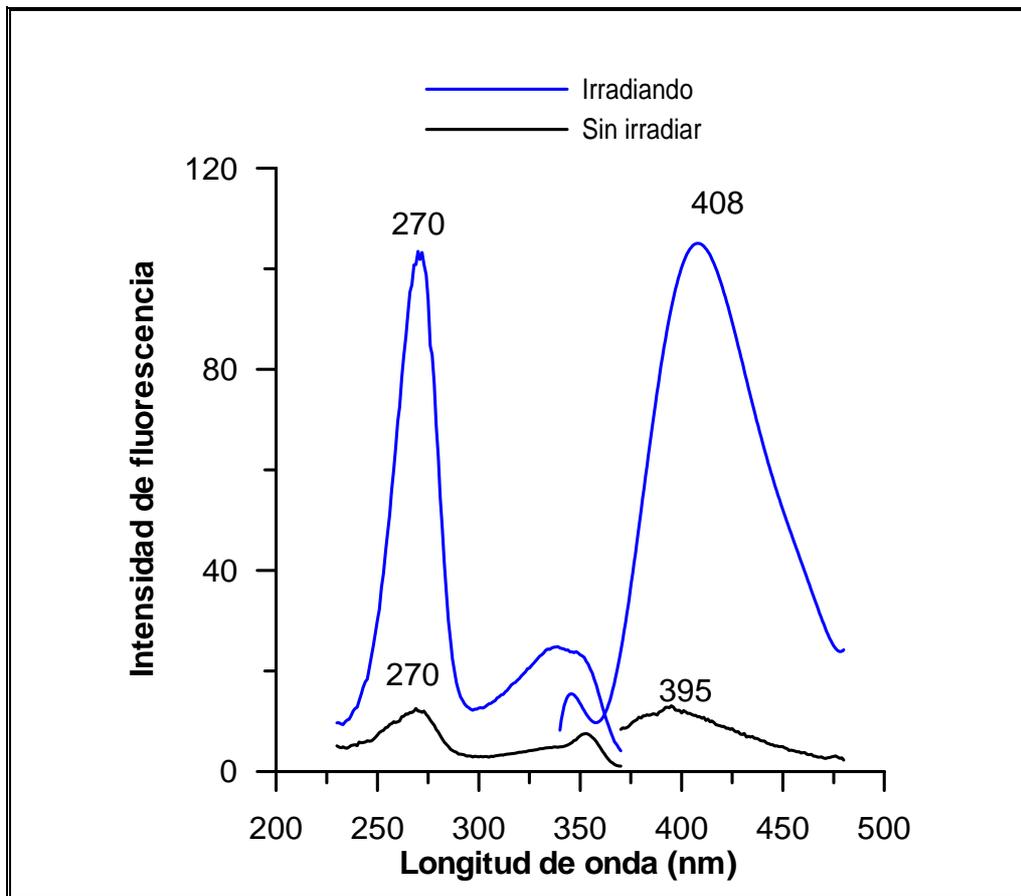


Figura V. 13. Espectros de excitación y emisión de las muestras irradiadas y sin irradiar a pH=6.

Con objeto de establecer las características del fotoproducto originado, y como paso previo, se procedió a calcular los valores de pK del enoxacino en la mezcla etanol agua al 50 %. En la Figura V.14 podemos observar los espectros obtenidos a pH 4.0, 9.5 y 11.0, así como la representación de la variación de la intensidad de fluorescencia a λ_{exc} 270 nm y λ_{em} de 358 y 398 nm.

Se observan notables desplazamientos batocrómicos de los máximos en medio ácido ($\lambda_{em} = 398 \text{ nm}$) y una disminución de la intensidad de fluorescencia a $\text{pH} > 5$, situándose el máximo a 358 nm a partir de $\text{pH} 7$.

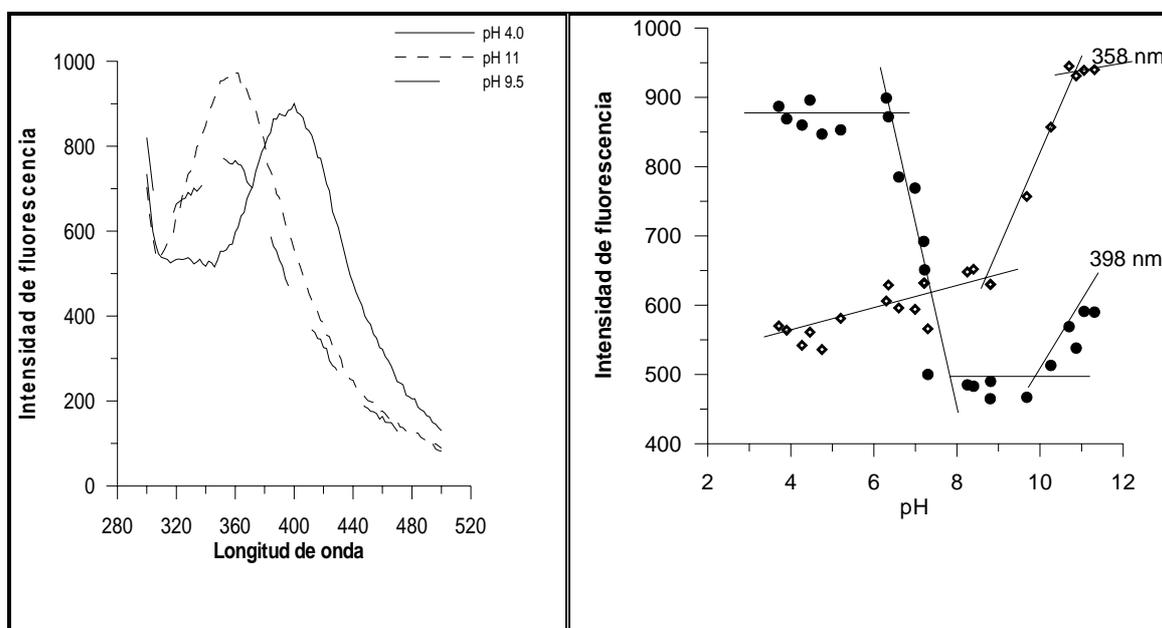
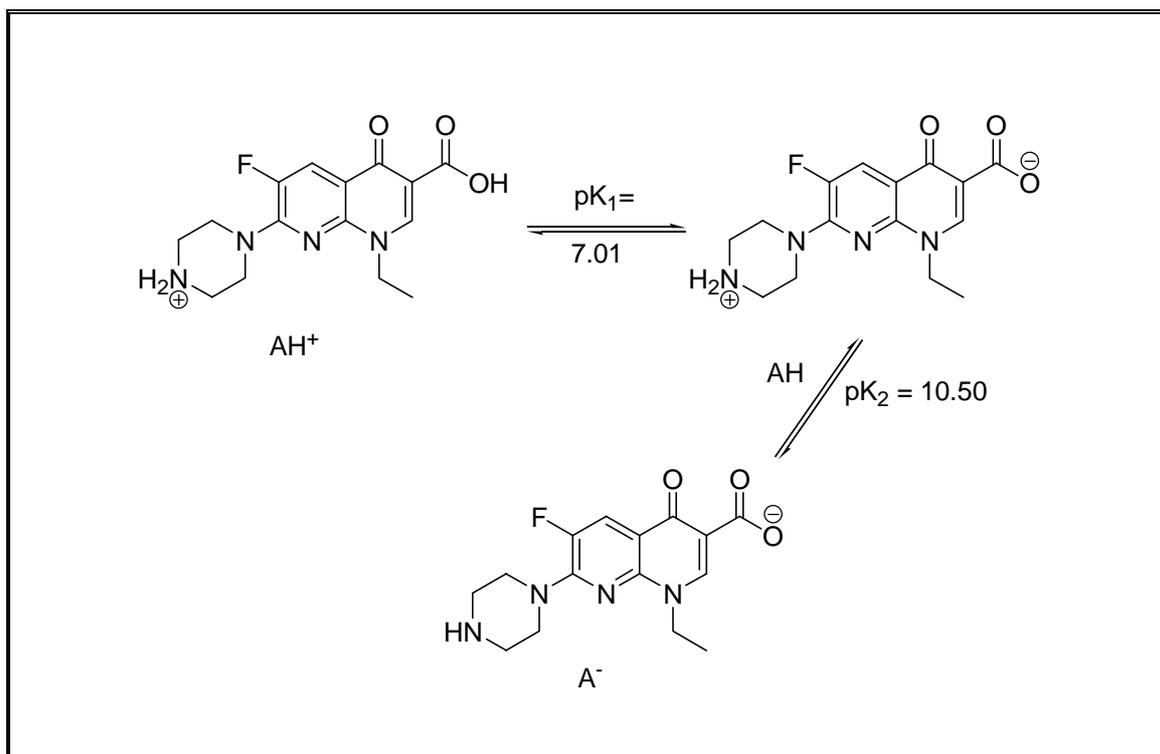


Figura V. 14. A) Espectros de emisión de enoxacino en medio etanol-agua (50%); B) Variación de la intensidad de fluorescencia a 358 y 398 nm con la acidez del medio.

Se calcularon¹¹ dos valores de pK de 7.01 y 10.50 respectivamente. Comparativamente con el medio acuoso se observa un desplazamiento de dichos valores como es de esperar debido a la mayor acidez de la mezcla etanol-agua.

¹¹ Brindes J.W., Davies S.D., Williams R.T., *Journal of Biochemistry*, 98, 451, 1966

Dichos pK se pueden asignar a los siguientes equilibrios:



Como consecuencia, la forma activa a la radiación debe ser predominantemente la forma protonada, ya que es a un pH aparente de 6.5 cuando se obtiene el mayor rendimiento en la obtención del fotoproducto.

Comportamiento ácido base del fotoproducto.

Dado que la mayor intensidad de fluorescencia se obtiene a partir de disoluciones neutras de enoxacino, pH próximos a 6.6, se procedió a generar el fotoproducto, para una vez alcanzado el equilibrio, establecer las propiedades ácido base del mismo modificando la acidez del medio por adición de pequeños volúmenes de ácido o base, de manera que las adiciones fueran despreciables frente al volumen final de muestra.

Así, a muestras de enoxacino a pH 6.6 e irradiadas durante 5 minutos, se las varió el pH y se registraron los espectros de excitación y emisión a cada valor de pH, utilizando células de cuarzo de 10 mL con agitación continua.

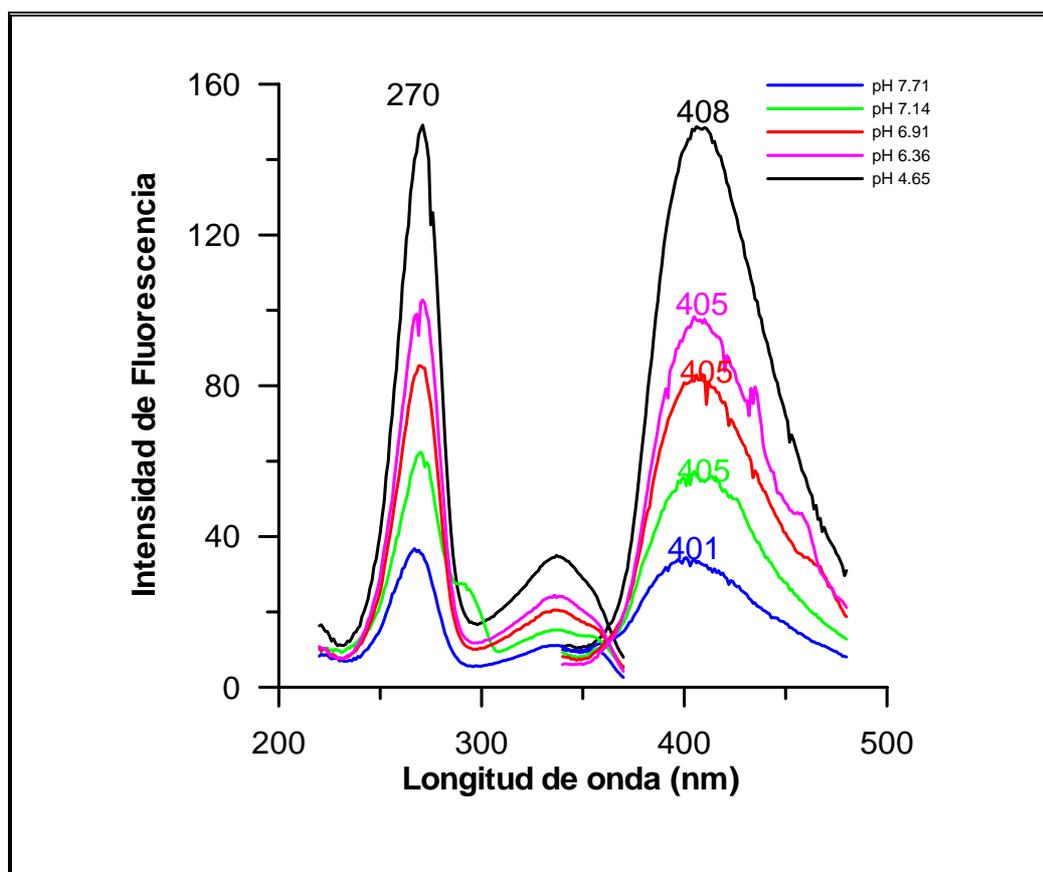


Figura V. 15.- Espectros de excitación y emisión del fotoproducto generado a partir del enoxacino cuando se varía el pH del medio.

En la Figura V.15 podemos observar como las mayores intensidades de fluorescencia, corresponden a la forma que se obtiene a pH ácidos, y que a medida que disminuye la acidez del medio se produce un descenso en la fluorescencia. Podemos observar como las especies comprendidas entre los pH 6.3 hasta 7.5 presentan los mismos máximos de emisión. A pH ácidos el máximo se desplaza a longitudes de onda ligeramente mayores (408 nm) y a pH básicos, el máximo se desplaza ligeramente a longitudes de onda inferiores (401 nm).

En la Figura V. 16 podemos ver la evolución de la intensidad de fluorescencia de la especie generada en función de la acidez del medio, λ_{ex} 271 nm y λ_{em} 408 nm.

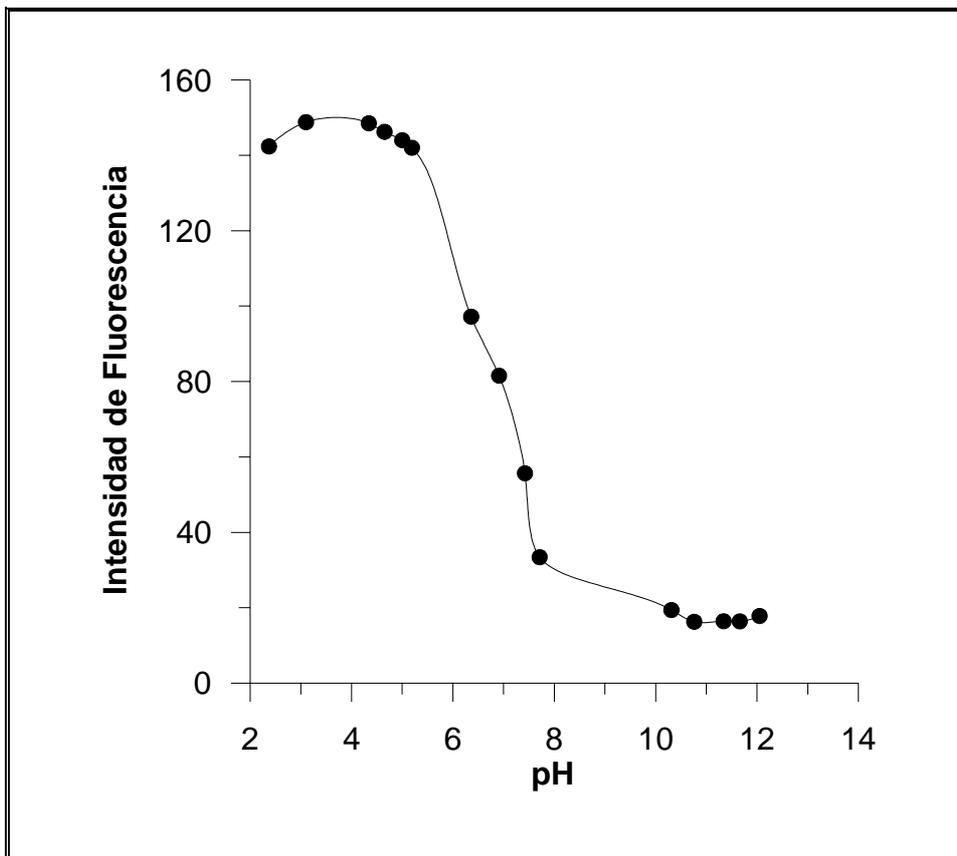


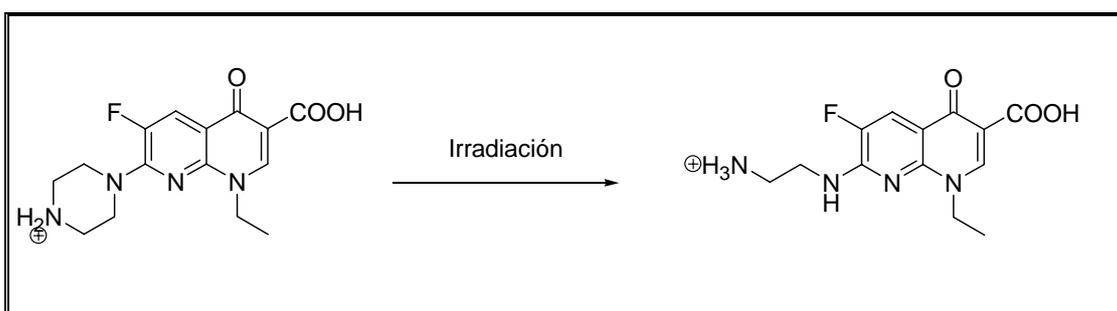
Figura V. 16.- Influencia del pH en la variación de la intensidad de fluorescencia del fotoproducto del enoxacino.

A partir de un pH próximo a 5 la intensidad de fluorescencia disminuye de forma drástica, permaneciendo aproximadamente constante a partir de un valor de pH próximo a 10.

Con estos datos, se puede llevar a cabo el cálculo¹¹ de un único valor de constante de acidez, resultando ser de 6,85.

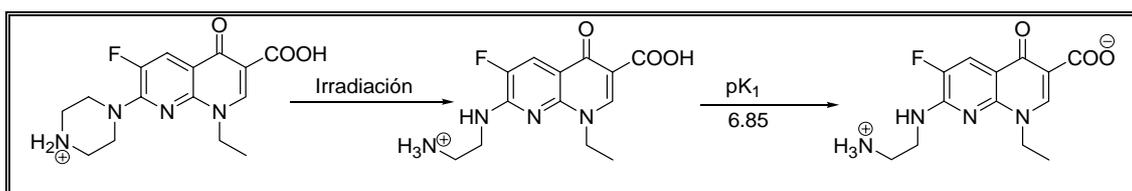
Como se ha indicado, el fotoproducto presenta un único valor de pK, que podría corresponder a la ionización del grupo carboxílico por semejanza con la molécula original. Sin embargo, no se observa el pK correspondiente a la desprotonación del anillo piperazínico calculado en la molécula original. Este hecho estaría de acuerdo con la pérdida y/o alteración de dicho anillo como consecuencia de la irradiación. Dicho comportamiento justificaría el notable aumento del rendimiento cuántico de fluorescencia del fotoproducto con respecto al enoxacin, así como el pequeño desplazamiento batocrómico mostrado por la λ de emisión.

En la bibliografía no se encuentra descrito el mecanismo de reacción. Sin embargo, los datos obtenidos estarían de acuerdo con la formación del correspondiente derivado de la etilendiamina¹², propuesto como producto de degradación del ciprofloxacino .



¹² Mazuel, C., Florey, K. (Ed.) Analytical Profiles of Drugs Substances, vol 20, Academic Press, 1991, N.Y.

El rendimiento cuántico de fluorescencia es máximo a pH inferior a 5. Este mecanismo es similar al propuesto para ciertos derivados fluoroquinolónicos de estructura parecida; aunque hay que tener en cuenta que la naturaleza del fotoproducto formado puede depender drásticamente de las condiciones de irradiación (potencia, tiempo.) y de las condiciones químicas (pH, disolvente...).



La posible segunda desprotonación resultaría tan débil en etanol-agua que no se ha observado. Por otra parte, se puede descartar la aparición de aminas primarias aromáticas ya que resultarían grupos H_2N^+ -aromático, cuyo pK debería presentar valores próximos a 4.

Una vez establecida las características fluorescentes del fotoproducto en función de la acidez del medio, se ha estudiado definitivamente como influye el tiempo de irradiación al pH óptimo de generación del fotoproducto. Para ello, se fijó una acidez inicial en 6.5 y se irradió la muestra durante diferentes tiempos. Se pudo observar como, a medida que se incrementa el tiempo de irradiación, la fluorescencia del fotoproducto es también mayor y, para tiempos de irradiación superiores a los cuatro minutos, la fluorescencia del fotoproducto se hace independiente del tiempo de irradiación (Figura V.17).

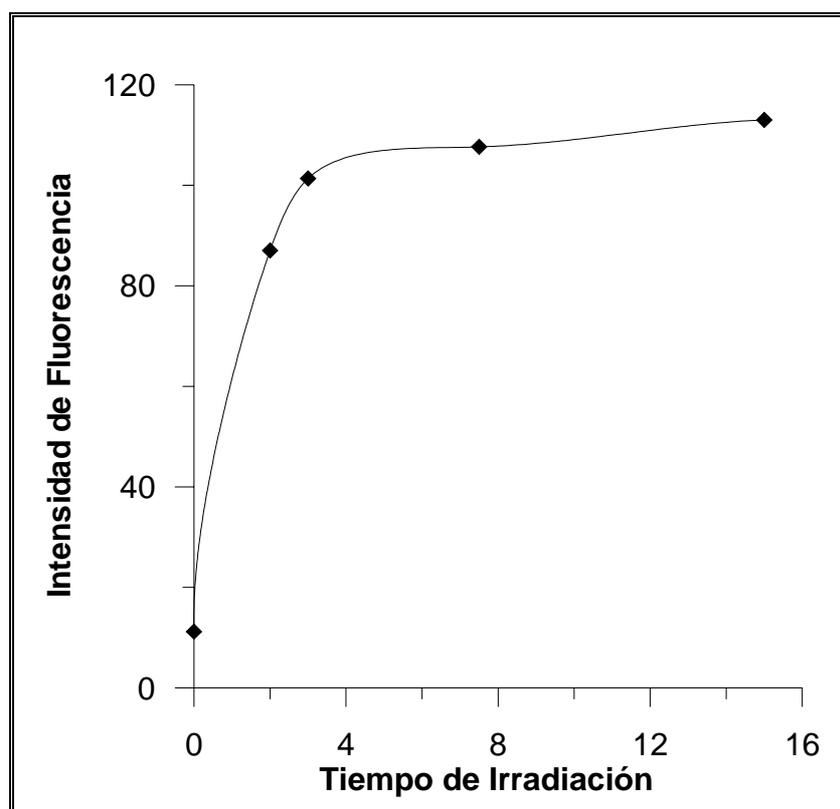


Figura V. 17.- Influencia del tiempo de irradiación sobre la generación del fotoproducto del norfloxacino a pH aparente de 6.5.

Se fija el tiempo de irradiación en cinco minutos y el pH aparente inicial en 6.5, mediante la adición de tampón Tris/HCl (0.75 mM).

Estudio de la linealidad de la señal fluorescente del fotoproducto en función de la concentración de enoxacin al pH óptimo de irradiación.

Para ello se registraron, por triplicado, diferentes patrones de concentraciones comprendidas entre 10 y 100 ng/mL. El potencial del detector se fijó en 750 V, las rendijas en 4 y 8 nm, para las de excitación y emisión, respectivamente. Los monocromadores se fijaron en 271 y 405 nm.

Los tratamientos estadísticos, correspondientes a los ajustes lineales y a los parámetros de calidad relacionados con la precisión y sensibilidad, se han calculado mediante un programa desarrollado en esta Memoria. Dicho programa se incluye como material adicional en un apéndice final de la Memoria.

El ajuste lineal (Figura V. 18), mediante la aplicación de mínimos cuadrados, arroja un coeficiente de regresión lineal de 0.998. En la tabla V.1. se han resumido dichos parámetros. Como se puede observar, se obtiene una buena linealidad en la medida de la fluorescencia del fotoproducto con respecto a la concentración de enoxacin. La precisión de las señales dentro de un mismo día y en diferentes días se ha establecido mediante análisis de disoluciones (10) conteniendo 40 ng/mL de enoxacin. Se obtuvo una desviación estándar en el mismo día de 1.44 ng/mL y de 1.12 ng/mL en diferentes días.

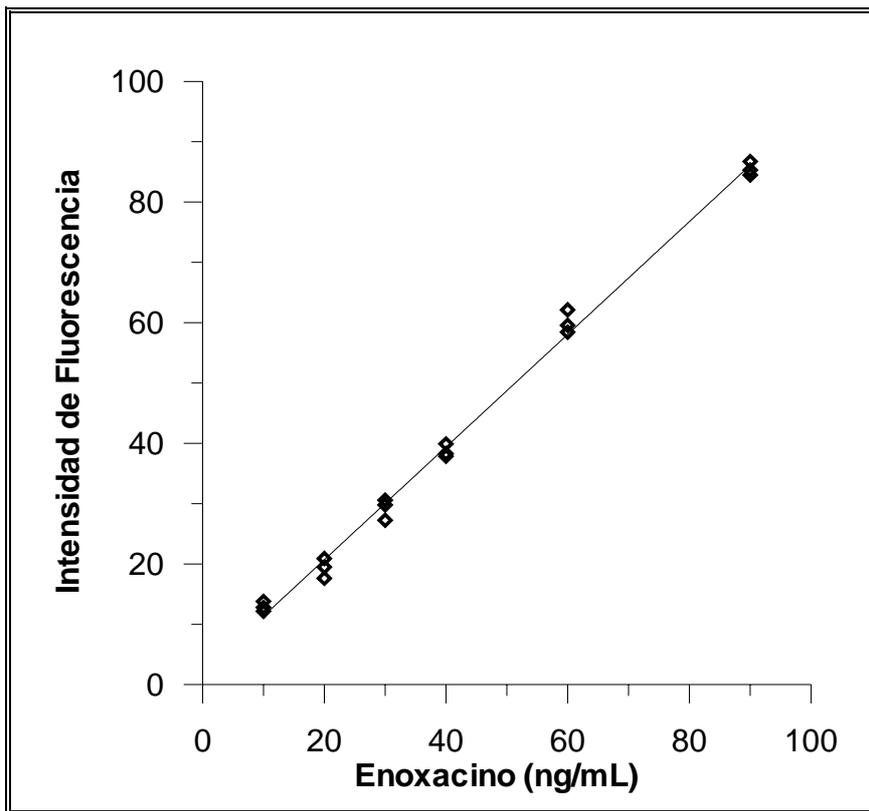


Figura V. 18.- Influencia de la concentración de enoxacino en la señal de fluorescencia del fotoproducto a pH = 6.6 ($\lambda_{exc} = 271$ nm; $\lambda_{em} = 405$ nm).

Tabla V. 4. Parámetros estadísticos relacionados con el ajuste lineal y parámetros de calidad para la determinación de enoxacino mediante fluorescencia inducida fotoquímicamente.

	Enoxacino
Ordenada Origen (S_0)	2.03±0.80
Pendiente (UFmL/ng) (S_p)	0.934±0.016
Coef. Regresión	0.998
S (R,c)	1.83
Linealidad (%)	98.3
Límite de detección Clayton (ng/mL) $\alpha = \beta = 0.05$	4.4
Límite de detección Winefordner y Long (k=3) (ng/mL)	2.6
Sensibilidad (ng/mL)*	2

* expresada como γ^{-1} .

Recta de calibrado para la determinación de enoxacino mediante fotoinducción.

Como podemos observar en los estudio de la influencia que ejerce el pH del medio en la fluorescencia de este analito, es a pH neutros (próximos a 7) donde la formación del fotoproducto tiene un mayor rendimiento; sin embargo es a pH ácidos, donde este fotoproducto presenta su más intensa fluorescencia. Debido a esto, una vez generado el fotoproducto a pH = 6.6 se hizo disminuir el pH hasta un valor aparente de 4.0 (mediante la adición de 20 μ L de una disolución 0.1 M de ácido clorhídrico) antes de registrar los espectros, observándose un incremento muy notable en la sensibilidad.

En estas condiciones, se construyó la correspondiente recta de calibración (Figura V. 19). Para ello, se prepararon por triplicado un total de cinco patrones de concentraciones comprendidas entre 5.0 -100 ng/mL. Los parámetros estadísticos del ajuste, así como las diferentes figuras de mérito aparecen resumidos en la Tabla V. 5.

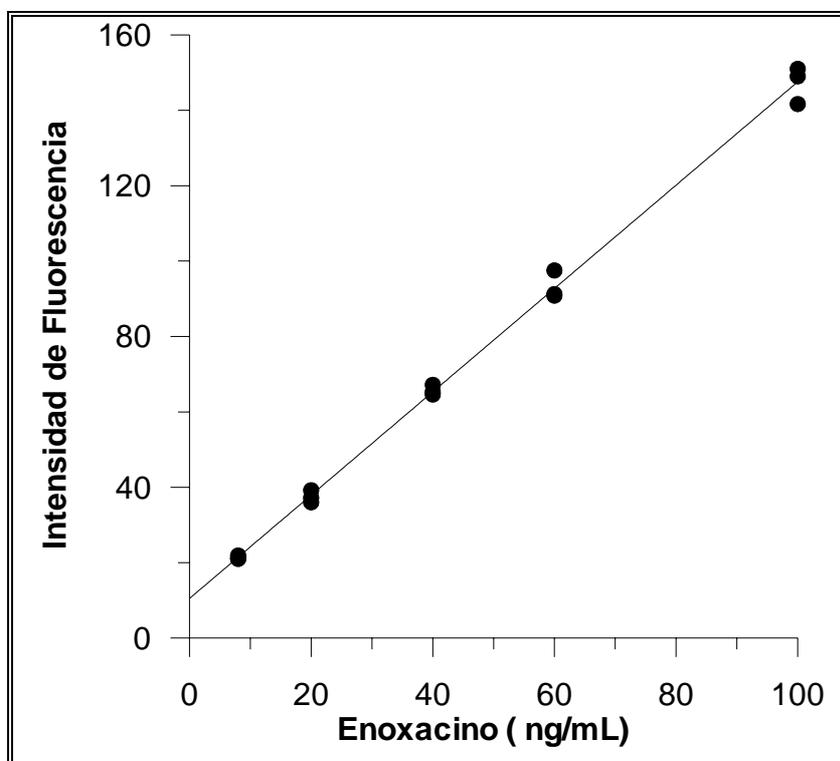


Figura V. 19. Recta de calibrado para la determinación de enoxacino a pH = 4.0, previa irradiación en las condiciones óptimas.

Tabla V. 5.-Resultados estadísticos del ajuste lineal y parámetros de calidad para la determinación de enoxacino a pH = 4.0

	Enoxacino
Ordenada Origen (So)	10.5±1.2
Pendiente (mL/ng) (Sp)	1.37±0.02
Coef. Regresión	0.998
S (R,c)	2.60
Linealidad (%)	98,49
Límite de detección Clayton (ng/mL) $\alpha = \beta = 0.05$	4.80
Límite de detección Winefordner y Long (k=3) (ng/mL)	2.55
Sensibilidad (ng/mL)*	1.89

* expresada como γ^{-1}

Se observa una adecuada linealidad en estas condiciones de máxima sensibilidad, obteniéndose una mejora notable en el límite de detección. Por otra parte, del estudio de la precisión de las señales dentro de un mismo día (10 réplicas independientes), se deducen unos valores de desviación estándar en el resultado de 78.3 ± 5.3 ng/mL y, en días diferentes (10 días), de 77.4 ± 5.5 ng/mL .

2.2. Efectos de la irradiación UV en las características luminiscentes del norfloxacin

Para todos los estudios que se han realizado con norfloxacin, se emplean disoluciones de concentración 0.01 $\mu\text{g/mL}$. El potencial del detector, se ha fijado en 750 V y, finalmente, las rendijas de emisión y excitación han sido establecidas en 8 nm. Las condiciones instrumentales de irradiación son semejantes a las descritas en el apartado anterior para enoxacin.

Siguiendo, por tanto, una sistemática similar a la ya descrita, en primer lugar se estudió como afecta el tiempo de irradiación a las propiedades fluorescentes de una disolución de norfloxacin, en la que la composición del disolvente es etanol:agua 50%. Se observa que a medida que el tiempo de exposición de la muestra a la irradiación externa es mayor, la fluorescencia de la muestra aumenta. El equilibrio parece alcanzarse aproximadamente a los 16 minutos. En la Figura V. 20 podemos ver esta evolución.

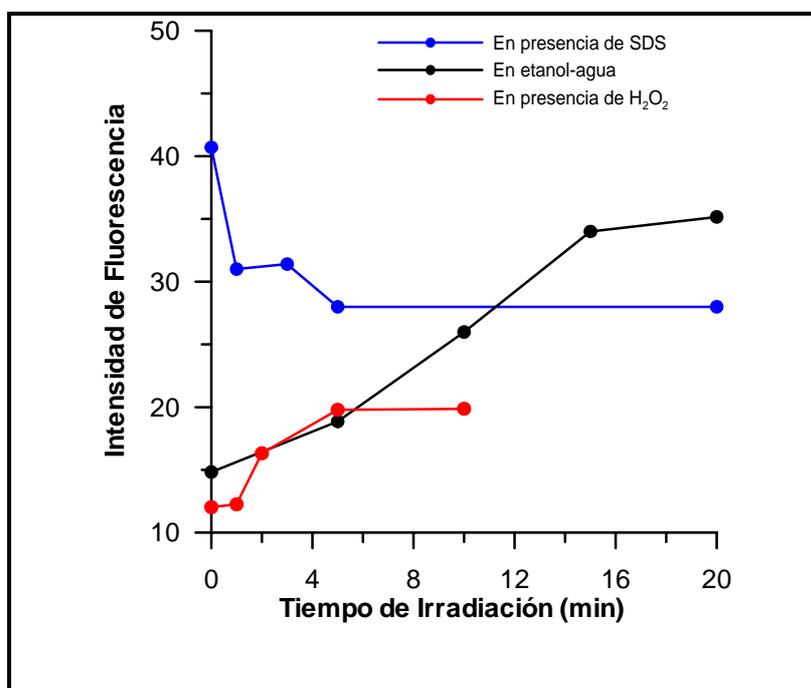


Figura V. 20.- Evolución de la intensidad de fluorescencia con el tiempo de irradiación para muestras conteniendo 0.010 $\mu\text{g/mL}$ de norfloxacin.

En presencia de peróxido de hidrógeno, la evolución de la fluorescencia del analito, cuando éste es sometido a una radiación externa, es similar a la observada para el enoxacino. La presencia de peróxido en una concentración de 0.43 mM hace aumentar la fluorescencia de la molécula a medida que se incrementa el tiempo de irradiación, sin embargo el valor de intensidad de fluorescencia alcanzado es menor que el observado en ausencia de peróxido de hidrógeno.

La presencia de un agente micelar produce en el analito un incremento importante en la fluorescencia del mismo. Sin embargo, a medida que se incrementa el tiempo de irradiación, cuando el analito se encuentra en presencia de este medio micelar, la fluorescencia disminuye. Estos efectos se pueden observar en la Figura V. 20. El rendimiento cuántico de fluorescencia obtenido en medio micelar presenta un valor similar al obtenido previa irradiación en medio hidroetanólico al 50%.

El norfloxacino en medio micelar presenta un rendimiento cuántico de fluorescencia similar al fotoproducto obtenido en medio hidroetanólico al 50%.

Influencia de la acidez del medio en el proceso de fotoirradiación

Con objeto de establecer las condiciones de acidez óptimas para llevar a cabo la obtención del fotoproducto del norfloxacino, se estudia la influencia del pH en sus propiedades fluorescentes en medio etanol agua al 50% en muestras irradiadas durante cinco minutos y sin irradiar.

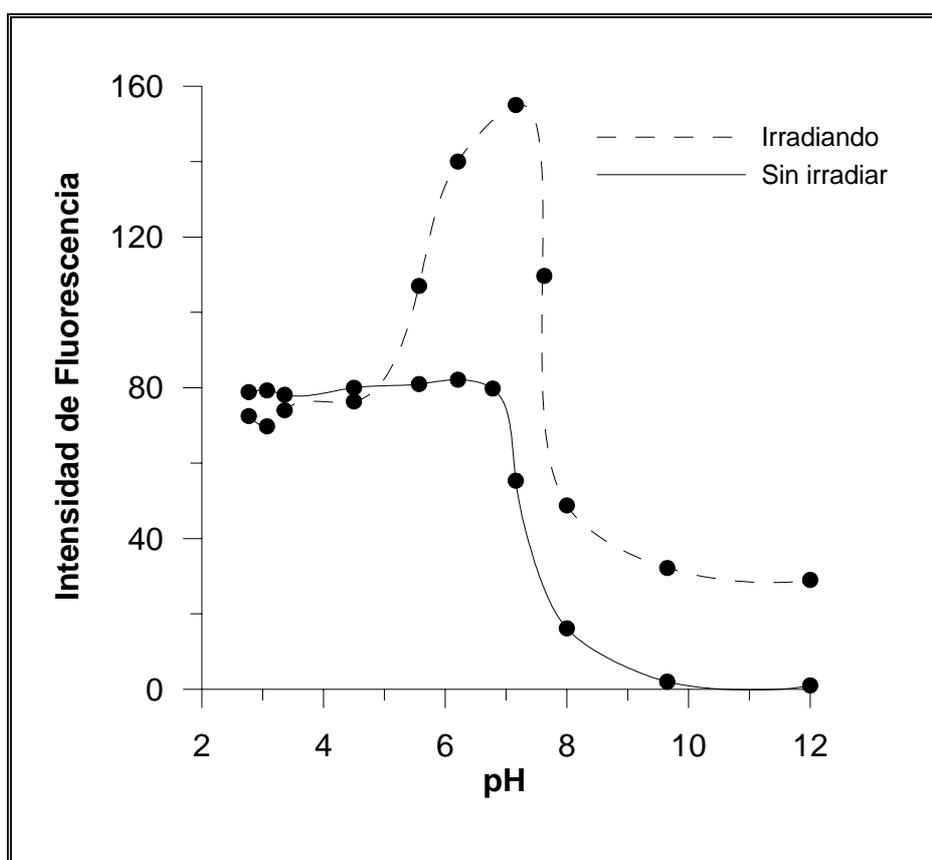


Figura V. 21.- Variación de la intensidad de fluorescencia en función del pH para muestras sin irradiar e irradiadas durante cinco minutos.

Podemos comprobar como cuando se irradia la muestra, la fluorescencia que se produce es considerablemente superior a la generada en ausencia de irradiación, para valores de acidez comprendidos entre pH 6.5-7.2. No sólo el fotoproducto generado tras la irradiación presenta una mayor fluorescencia, sino que además presenta unas propiedades espectrales diferentes, tal como podemos observar en la Figura V. 22. Vemos como el máximo de excitación permanece prácticamente invariable en las diferentes formas iónicas del analito, mientras que el máximo de emisión si que varía en función del pH.

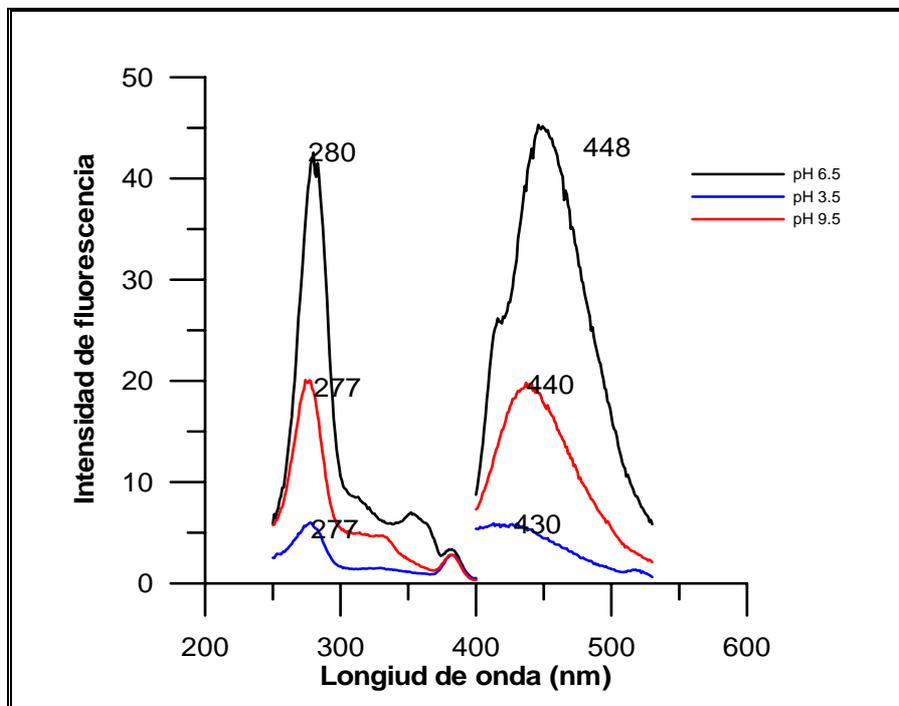


Figura V. 22.- Espectros de excitación y emisión del fotoproducto generado a partir de disoluciones de norfloxacino a diferentes valores de pH.

Al igual que en el caso anterior, la forma más fluorescente es aquella que se genera cuando la fluoroquinolona es irradiada a un pH próximo a la neutralidad. Si comparamos los espectros del fotoproducto generado a este pH, con el que genera el analito sin irradiar a este mismo pH, no sólo podemos comprobar la correspondiente diferencia en las intensidades de fluorescencia, sino que además podemos observar un ligero cambio en los valores de los máximos de emisión y excitación. Podemos comprobar como la diferencia entre los máximos de emisión es superior a 10 nm, mientras que los correspondientes máximos de excitación prácticamente no sufren modificación (3 nm).

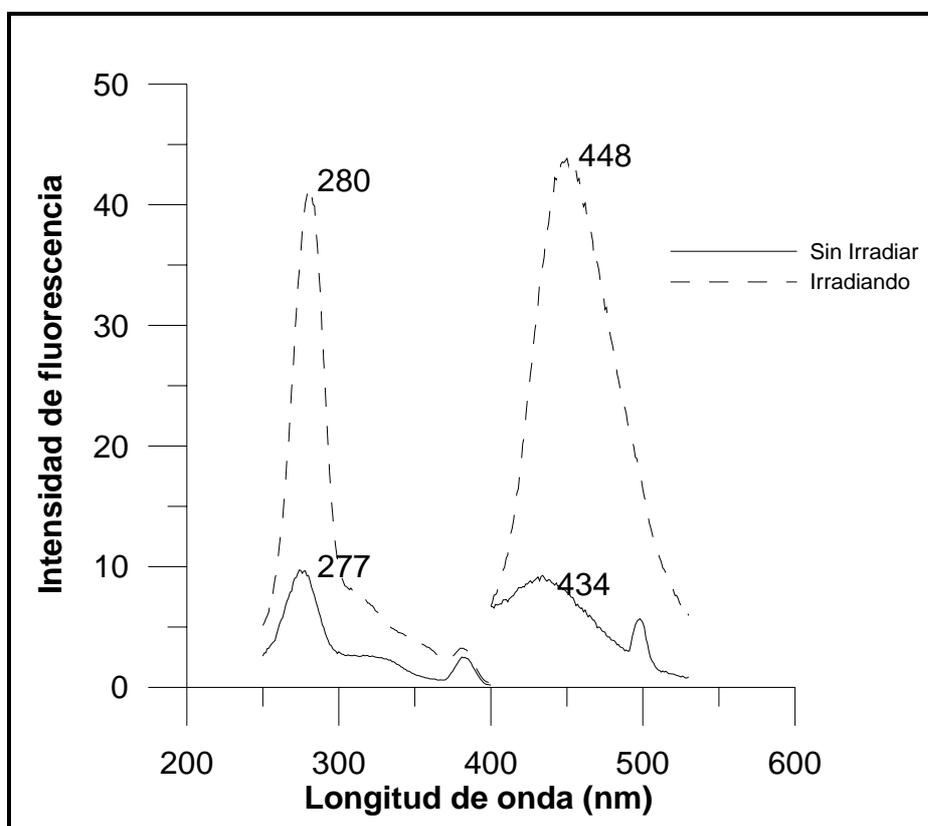


Figura V. 23.- Espectros de excitación y emisión del norfloxacin a pH 6.5 y del fotoproducto obtenido a los cinco minutos de irradiación.

Al igual que en el caso anterior, la mayor fluorescencia del fotoproducto se genera cuando éste se encuentra en un pH comprendido entre 6-7.

Con objeto de establecer la posible naturaleza del fotoproducto originado se procedió a calcular los valores de pK del norfloxacinó en la mezcla etanol agua al 50 %, para compararlos con los del fotoproducto. En la Figura V. 24 podemos observar la variación de la intensidad de fluorescencia a λ_{ex} 277 nm y λ_{em} de 437 nm, en función del pH para el norfloxacinó en medio hidroetanólico al 50 %.

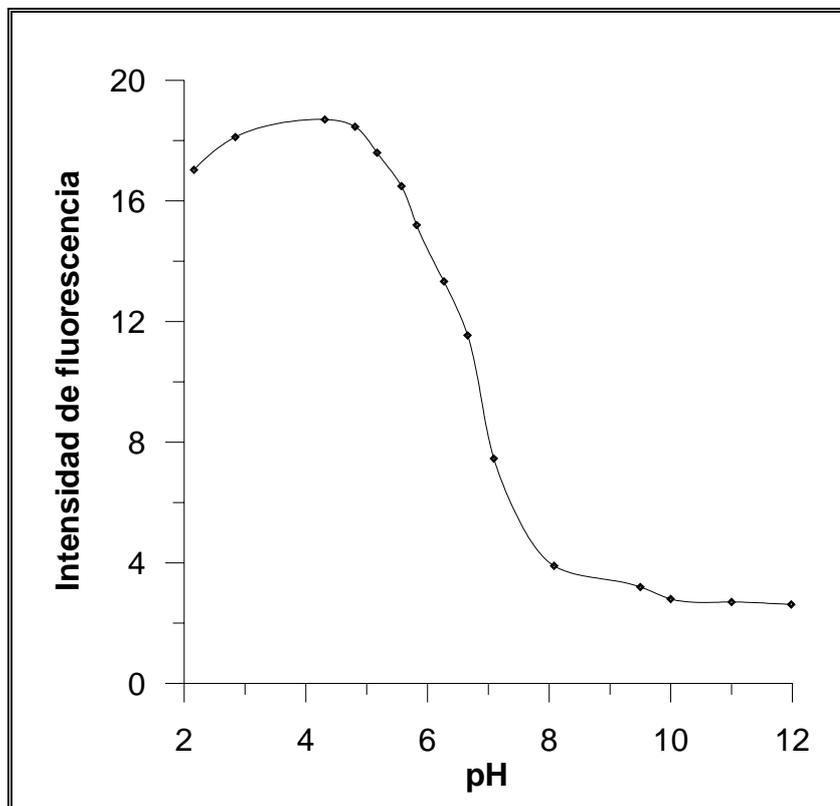
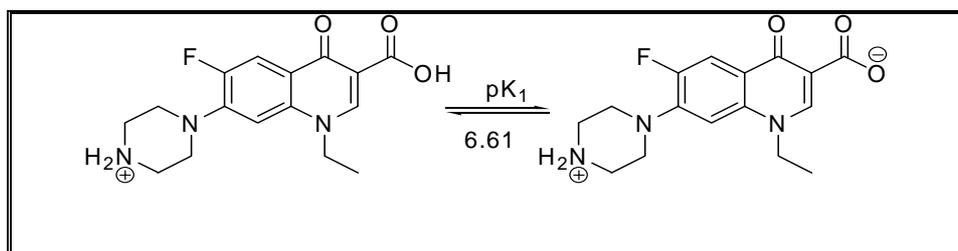


Figura V. 24.- Variación de la Intensidad de Fluorescencia del norfloxacinó en función de pH en medio hidroetanólico al 50 %.

El valor de pK calculado¹¹ fue de 6,61. Comparativamente con el medio acuoso, se observa un desplazamiento de dicho valor, debido a la mayor acidez de la mezcla etanol agua. Recordemos que en medio acuoso fueron calculados los correspondientes pK, y sus valores fueron de 5,90 y 8,77.

El equilibrio que podemos asociar a este pK sería:



El segundo posible pK₂ asociado a la desprotonación del grupo piperacínico no se llega a observar dada su previsible debilidad como ácido en el medio hidroalcohólico.

Según lo indicado anteriormente, la forma predominante óptima para la generación del fotoproducto es la protonada, ya que a pH aparente aproximadamente 7.5 la intensidad de fluorescencia decae completamente. A continuación, fijamos inicialmente la acidez del medio en un valor óptimo de 6.5, mediante la adición de un pequeño volumen de hidróxido sódico, posteriormente se irradia durante cinco minutos y por último se modifica la acidez hasta el valor de pH aparente deseado en la disolución del fotoproducto.

Comportamiento ácido-base del fotoproducto generado a partir de norfloxacino.

Dado que la mayor intensidad de fluorescencia se obtiene a partir de disoluciones neutras de norfloxacino, a pH próximos a 6.5, se procedió a generar el fotoproducto para, una vez alcanzado el equilibrio, establecer las propiedades ácido base del mismo.

De este modo, a muestras de norfloxacino a pH 6.5 e irradiadas durante 5 minutos, se las modificó el pH adicionando los volúmenes correspondientes de disoluciones de hidróxido sódico y ácido clorhídrico, respectivamente, y se registraron los espectros de excitación y emisión a cada valor de pH.

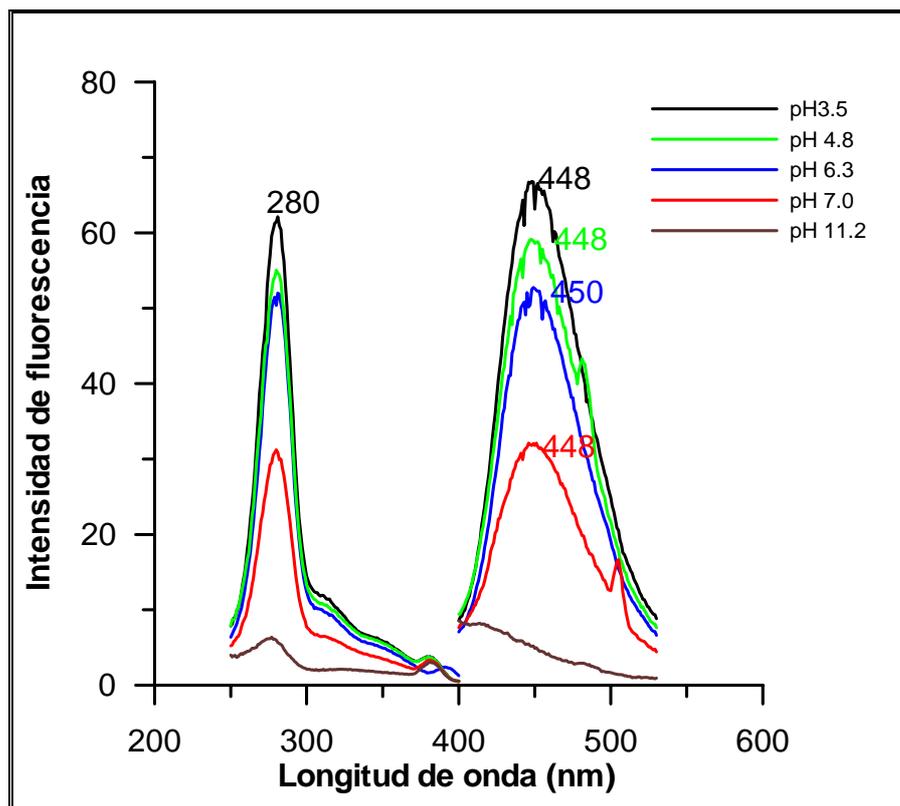


Figura V. 25.- Espectros de excitación y emisión de disoluciones del fotoproducto del norfloxacino (NOR*) en función del pH.

Podemos observar como prácticamente no se produce modificación en los máximos de los espectros, observándose tan solo una variación en la intensidad de fluorescencia del fotoproducto. Si representamos gráficamente como varía la fluorescencia en función del pH, esta variación puede verse de forma más evidente.

En la Figura V.26 podemos ver la evolución de la intensidad de fluorescencia de la especie en función de la acidez del medio (λ_{ex} 277 nm y λ_{em} 437 nm.).

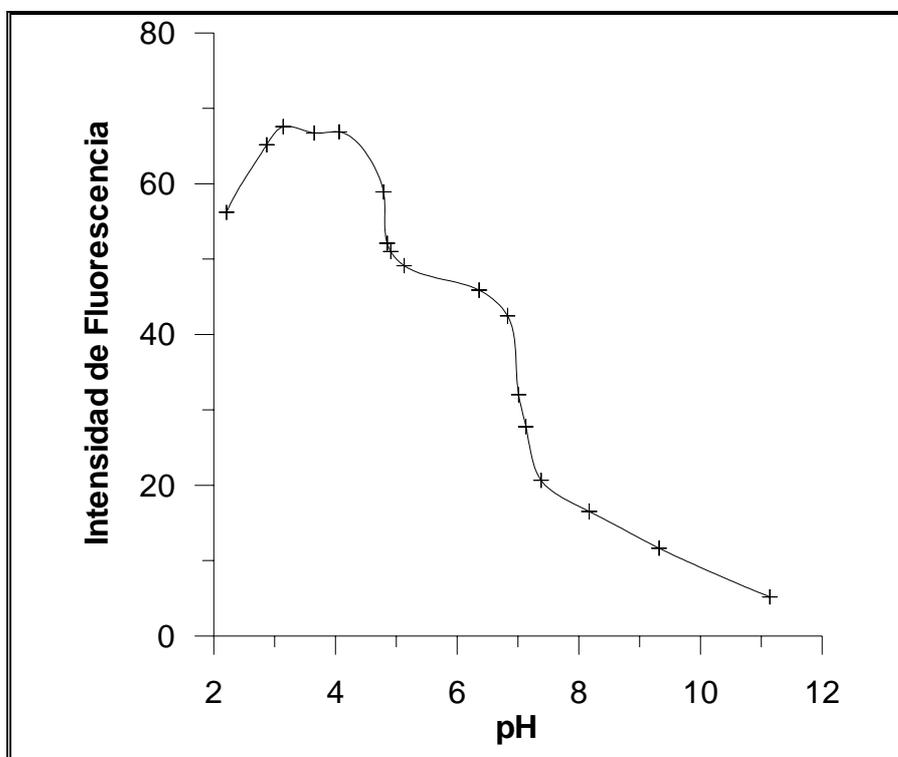


Figura V. 26.- Influencia del pH en la intensidad de fluorescencia del NOR*.

Con los resultados aquí representados podemos llevar a cabo el cálculo de los correspondientes valores de pK. Gráficamente, podemos observar dos cambios, el primero a pH ácidos, próximos a 4.5 y el segundo a pH neutro, en torno a 7. Los valores calculados son de 4.70 y 7.13 respectivamente.

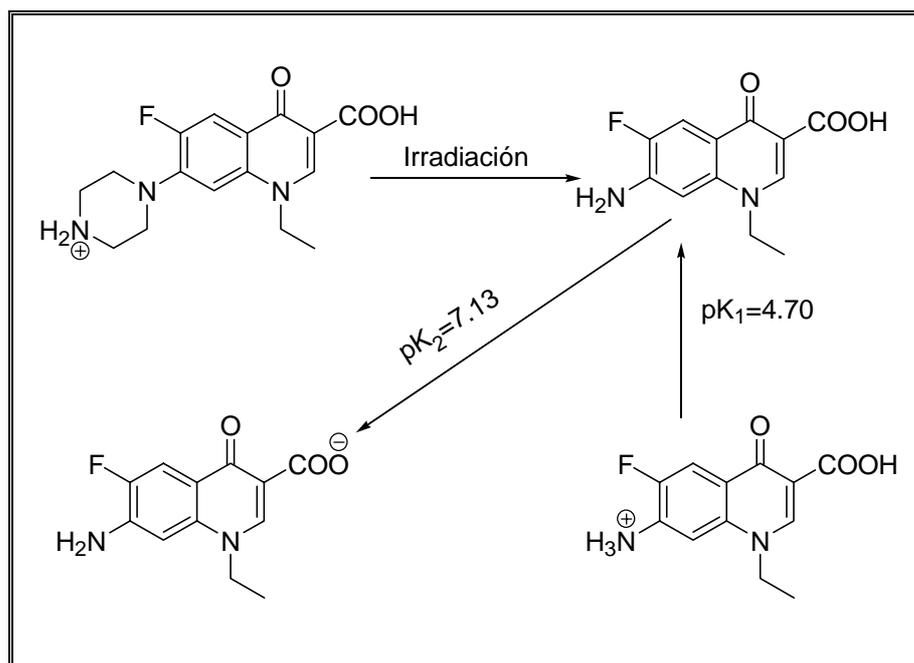
Estas conclusiones estarían de acuerdo con los datos bibliográficos de pK para grupos aminos primarios aromáticos y carboxílicos sustituidos. También, el notable desplazamiento batocrómico observado entre la λ emisión del fotoproducto (448 nm) y el norfloxacino original (434 nm) hace pensar en una notable variación estructural.

Sin embargo, en la bibliografía¹³ (aunque en condiciones de irradiación más drástica) se propone como estructura más probable del fotoproducto el derivado de etilendiamina de forma similar a la descrita para el enoxacino. Los valores de pK obtenidos son incompatibles con dicha propuesta. Una estructura similar a la descrita aquí para el norfloxacino ha sido propuesta a partir del ciprofloxacino, fluoroquinolona de estructura muy similar al norfloxacino¹⁴.

Dicho comportamiento parece indicar la presencia en la fotomolécula de dos grupos ácidos en las condiciones químicas establecidas. Un primer $pK_1=4.70$ puede ser asignado a la desprotonación del grupo NH_3^+ sustituido en el anillo piperacínico y un segundo $pK_2=7.13$ a la desprotonación del grupo carboxílico en el anillo heterocíclico. Proponemos como posibles las siguientes estructuras en función del pH:

¹³ Córdoba, M.; Córdoba-Díaz, M.; y Córdoba-Díaz, D.; *J. of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 18, 919, 1999

¹⁴ Schmitt, P.H.; Lopplin, J.; Burhenne, D.; Freitay, M.; Spitteller, A.; Kettrup, J.; *J. of Chromatography A*. 837,253, 1999.



Hay que tener en cuenta que la naturaleza del compuesto formado depende de las condiciones instrumentales y químicas fijadas para la irradiación.

Una vez establecidas las características fluorescentes del fotoproducto en función de la acidez del medio, se ha estudiado como influye el tiempo de irradiación al pH seleccionado como óptimo. Para ello, se fijó la acidez inicial en 6.5 y se irradió la muestra durante diferentes tiempos. Se pudo observar como, a medida que se incrementa el tiempo de irradiación, se produce un aumento en la fluorescencia, hasta llegar a un valor de tiempo, en el cual la fluorescencia se hace independiente del tiempo de irradiación. (Figura V. 27).

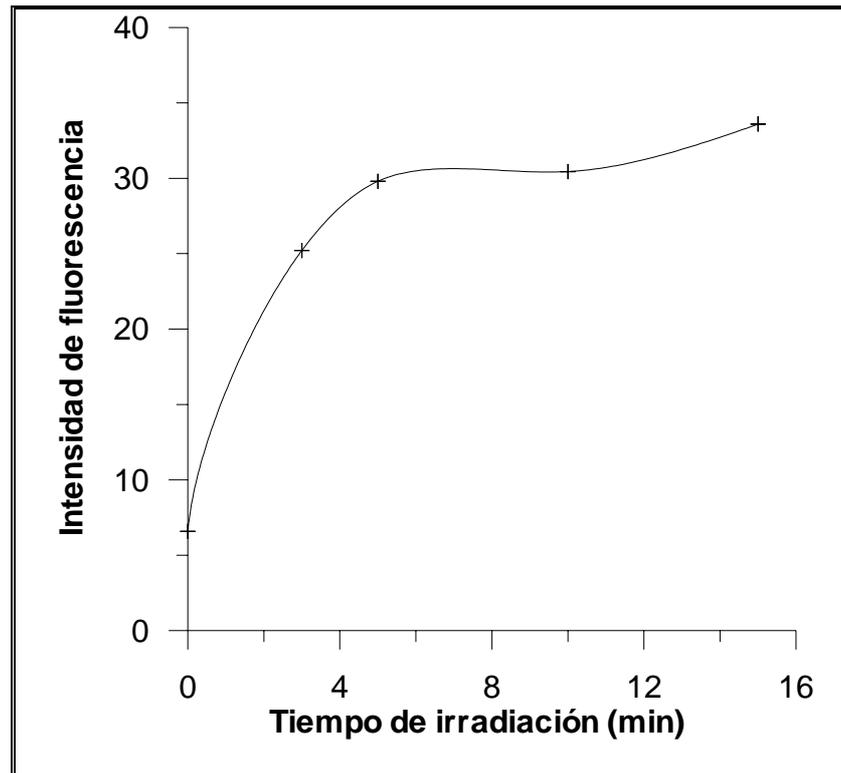


Figura V. 27.- Influencia del tiempo de irradiación sobre la señal fluorescente del NOR* obtenida al pH óptimo de irradiación. (λ_{ex} 277 y λ_{em} 437 nm).

Recta de calibrado para la determinación de norfloxacin mediante fotoinducción

Fijando como tiempo de irradiación suficiente cinco minutos y el pH aparente inicial en 6.5, establecido mediante la adición de tampón Tris/HCl (0.75 mM), se estudió la relación entre la señal obtenida y la concentración de norfloxacin inicial.

Para ello, se registraron por triplicado diferentes patrones de concentraciones comprendidas entre 4.0 y 50.0 ng/mL de norfloxacin. El potencial del detector fue fijado en 750 V y las rendijas de emisión y excitación en 4 y 8 nm, para la de excitación y emisión, respectivamente. Los monocromadores fueron fijados en 277 y 437 nm.

El ajuste lineal, mediante la aplicación de mínimos cuadrados (según se indicó en el apartado anterior) permitió calcular un coeficiente de regresión lineal de 0.9980.

Se ha estudiado la repetitividad de las señales dentro de un mismo día para diez replicas diferentes, y en diez días diferentes. Para ello, se prepararon disoluciones de 40 ng/mL de norfloxacin. Se observa una desviación estándar en el resultado de 1.66 ng/mL. Para días diferentes los resultados son similares, obteniéndose una desviación para un total de diez días de 1.72 ng/mL. Los parámetros estadísticos y de calidad aparecen resumidos en la Tabla V. 6.

Tabla V. 6.- Parámetros relacionados con el ajuste lineal a pH=6.5.

	Norfloxacino
Ordenada Origen (So)	6.53±0.615
Pendiente (UF.mL/ng) (Sp)	1.29±0.020
Coefficiente. Regresión	0.998
S (R,c)	1.40
Linealidad (%)	98,41
Límite de detección Clayton (ng/mL) $\alpha = \beta = 0.05$	2.70
Límite de detección Winefordner y Long (k=3) (ng/mL)	1.45
Sensibilidad (ng/mL)*	1.08

* expresada como γ^{-1}

Se observa que, una vez generado el fotoproducto, el mayor rendimiento cuántico de fluorescencia se produce en el intervalo comprendido entre pH 3 y 5. Como consecuencia, con objeto de obtener la máxima sensibilidad, se procedió al establecimiento de la linealidad de la señal a pH = 4.0. La recta de calibrado en estas nuevas condiciones se puede observar en la Figura V. 28.

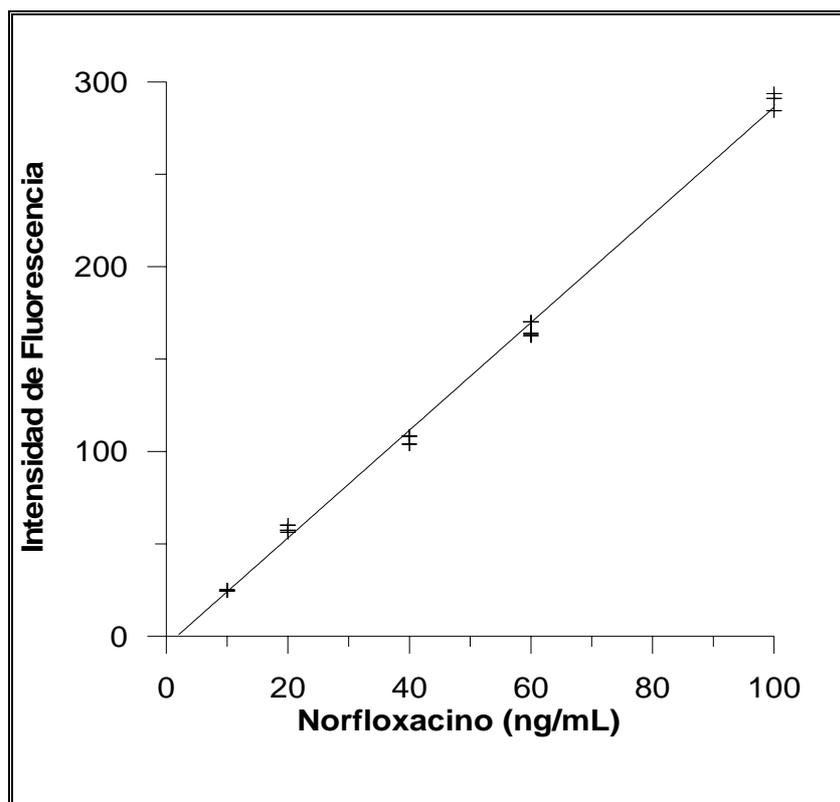


Figura V. 28.- Recta de calibrado para la determinación de norfloxacin por fluorescencia inducida fotoquímicamente.

Tabla V. 7.- Parámetros estadísticos relacionados con la determinación de norfloxacin.

	Norfloxacin
Ordenada Origen (So)	-5.03±2.24
Pendiente (UF.mL/ng) (Sp)	2.91±0.04
Coef. Regresión	0.999
S (R,c)	4.95
Linealidad (%)	98,63
Límite de detección Clayton (ng/mL)	4.33
$\alpha = \beta = 0.05$	
Límite de detección Winefordner y Long (k=3) (ng/mL)	2.30
Sensibilidad (ng/mL)*	1.70

* expresada como γ^{-1}

Se obtiene una adecuada linealidad en todo el intervalo de concentraciones para norfloxacino, así como un notable incremento en el valor de sensibilidad de la calibración. Por otra parte, del estudio de la precisión de la señales dentro de un mismo día (10 réplicas independientes) se deducen unos valores de desviación estándar del resultado de 82.0 ± 2.4 ng/mL y, en días diferentes (10 días), de 79.0 ± 2.7 ng/mL.

2.3. Efectos de la irradiación UV en las características luminiscentes del ofloxacin.

Para los estudios realizados, se han empleado disoluciones de ofloxacin de 0.01 µg/mL y condiciones instrumentales similares a las empleadas en los estudios anteriormente descritos

Dado que para el enoxacin, el analito que presenta una menor sensibilidad, las condiciones favorables, en cuanto a la composición del disolvente son de 50 % etanol y 50 % agua; se ha estudiado como influye el tiempo de irradiación en disoluciones de ofloxacin en dicho medio. Se comprueba que esta irradiación no ejerce un efecto notable en cuanto a la fluorescencia del componente; produciéndose incluso una disminución de la misma.

También se ha estudiado como influye la presencia de peróxido de hidrógeno en la fluorescencia de este analito. Se ha fijado la misma concentración fijada para el enoxacin, es decir, una concentración de 0.43 mM, empleando una composición del disolvente de 50 % etanol agua. Nuevamente, el efecto que se observa es contrario al observado para el enoxacin, ya que para esta concentración de peróxido, un incremento en el tiempo de irradiación produce una disminución en la fluorescencia de la muestra. Tampoco se observan variaciones significativas al irradiar en medio micelar.

Luego se puede concluir que la irradiación de la molécula de ofloxacin no genera un fotoproducto de forma apreciable. Sin embargo, y con objeto de establecer su comportamiento en las condiciones de irradiación establecida, con el fin de llevar a cabo posibles determinaciones simultáneas con otras fluoroquinolonas, se procede a estudiar diferentes variables.

Influencia de la acidez del medio en el proceso de irradiación del ofloxacino.

Al estudiar el efecto que ejerce la modificación de la acidez del medio, para este analito, en un medio disolvente etanol agua, se observó que la irradiación externa no produce modificaciones en el comportamiento fluorescente de este principio activo.

Se preparó una disolución de ofloxacino en etanol agua, y mediante la adición de volúmenes correspondientes de disoluciones de ácido clorhídrico e hidróxido sódico, se fue modificando el pH y se registraron los correspondientes espectros de emisión y excitación fluorescente. En la Figura V. 29 se representa la variación de la intensidad de fluorescencia en función del pH; fijando la λ_{exc} 290 nm y λ_{em} 497 nm.

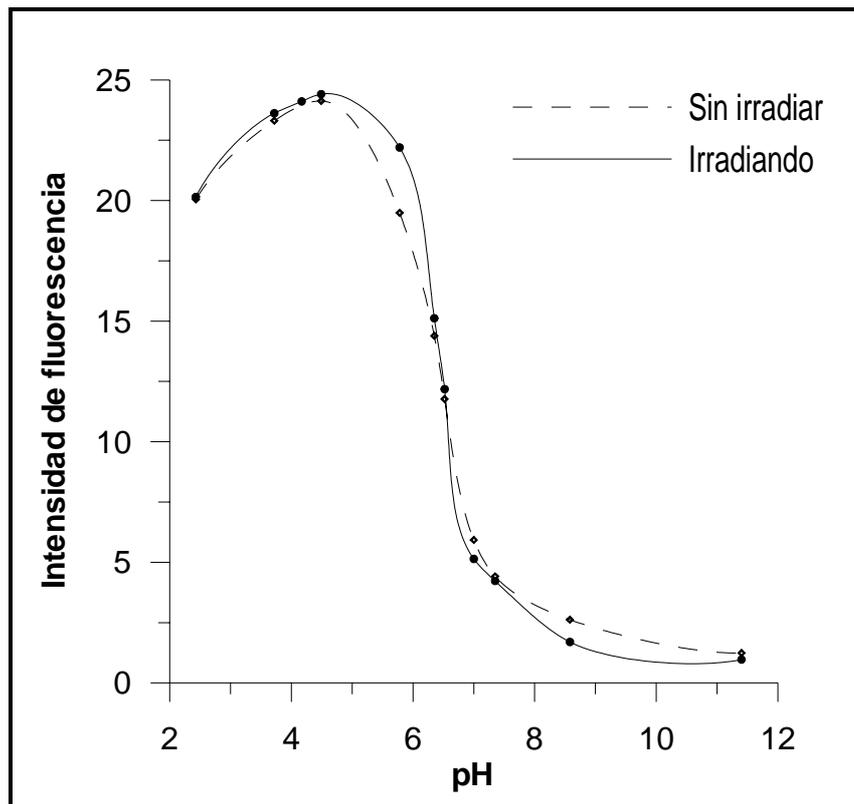


Figura V. 29.- Influencia del pH en la intensidad de fluorescencia del ofloxacino en medio hidroetanólico.

Mediante el empleo de estos datos, podemos llevar a cabo el cálculo de la correspondiente constante de acidez, en este medio de trabajo. El valor calculado para esta constante es de 6.42, concordante con la ionización del grupo carboxílico. No se observa ningún otro valor de pK.

Dado que la fluorescencia del analito no se modifica considerablemente al irradiar, se completó el estudio fijando las mismas condiciones establecidas para los otros dos analitos.

Recta de calibrado para la determinación de OFLO mediante fotoinducción

Así, fijando un tiempo de irradiación en 5 minutos y un pH inicial en 6.5, establecido mediante la adición de tampón Tris/HCl (0.75 mM), se estudió la relación entre la señal obtenida en estas condiciones y la concentración de ofloxacin. Para ello, se registraron por triplicado, diferentes patrones de concentraciones comprendidas entre 10 y 80 ng/mL. El potencial del detector fue fijado en 750 V, las rendijas de excitación y emisión en 4 y 8 nm; y los monocromadores en 290 nm y 490 nm para excitación y emisión, respectivamente. Realizando el ajuste lineal, mediante la aplicación de ajustes por mínimos cuadrados siguiendo la sistemática indicada en los casos anteriores, obtenemos un coeficiente de regresión lineal de 0.9988 (Tabla V. 8).

Se ha estudiado la repetitividad de las señales dentro de un mismo día y en días diferentes. Se observa una desviación estándar en el resultado de 1.82 ng/mL (n=10) en un mismo día y para días diferentes de 1.93 ng/mL

Tabla V. 8.- Parámetros del ajuste lineal y de calidad para la irradiación del ofloxacino.

	Ofloxacino
Ordenada Origen	4.10±0.83
Pendiente (UF.mL/ng)	1.18±0.02
Coef. Regresión	0.999
S (R,c)	1.67
Linealidad (%)	98,57
Límite de detección Clayton (ng/mL) $\alpha = \beta = 0.05$	3.75
Límite de detección Winfordner y Long (k=3) (ng/mL)	2.11
Sensibilidad (ng/mL)*	1.41

* expresada como γ^{-1}

Del mismo modo que para el principio activo anterior, se observa como al reducir el pH a 4, se produce un incremento de la fluorescencia del mismo, como era previsible deducir del comportamiento ácido base del ofloxacino establecido en el capítulo II. Es por ello, por lo que de forma análoga al caso anterior se construye la correspondiente recta de calibrado (Figura V. 30) en estas nuevas condiciones, con objeto de establecer la relación entre la señal de fluorescencia del ofloxacino y la concentración en las condiciones elegidas como óptimas para generar los fotoproductos derivados del enoxacino y del norfloxacin.

La observación de los parámetros estadísticos del ajuste lineal, pone de manifiesto la adecuada relación lineal entre señal y concentración así como el bajo límite de detección obtenido para el ofloxacino (Tabla V. 9).

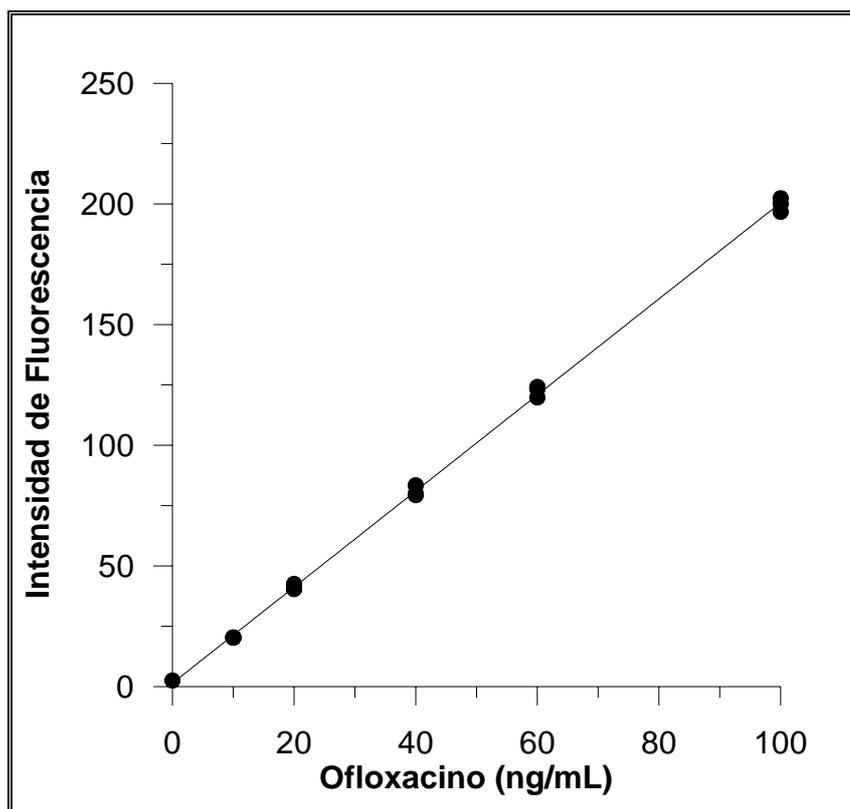


Figura V. 30.- Recta de calibrado para ofloxacino a pH=4.0 en medio hidroetanólico al 50 % previa irradiación durante 5 minutos.

Tabla V. 9.- Parámetros estadísticos de la calibración de ofloxacino a pH=4.0.

	Ofloxacino
Ordenada Origen (So)	1.14±0.91
Pendiente (ng/mL) (Sp)	1.99±0.02
Coef. Regresión (r ²)	0.999
S (R,c)	2.01
Linealidad (%)	99.18
Límite de detección Clayton (ng/mL) $\alpha = \beta = 0.05$	2.56
Límite de detección Winefordner y Long (k=3) (ng/mL)	1.36
Sensibilidad (ng/mL)*	1.01

* expresada como γ^{-1}

2.4. Efectos de la irradiación UV en las características luminiscentes del ciprofloxacino.

Siguiendo un esquema similar a los analitos estudiados anteriormente, se preparó una disolución de ciprofloxacino de concentración 0.1 µg/mL y se registraron los espectros de excitación y emisión cuando se han previamente irradiado las disoluciones en condiciones similares a las indicadas para las fluoroquinolonas anteriores.

La intensidad de fluorescencia aumenta notablemente en las muestras irradiadas con respecto al ciprofloxacino original. También se observan desplazamientos batocrómicos en el máximo de emisión del posible fotoproducto.

Se ha estudiado como influye el tiempo de irradiación en las características fluorescentes de disoluciones hidro-alcohólicas (50 %) de ciprofloxacino. En la figura Figura V.31 se muestra la variación de la intensidad de fluorescencia en función del tiempo de irradiación. Se puede observar como se produce un incremento inicial de la fluorescencia, para permanecer aproximadamente constante entre 4-14 minutos y para finalmente disminuir.

Del mismo modo, se ha ensayado como influye la presencia de un agente tensoactivo en el efecto que ejerce la irradiación externa en las propiedades fluorescentes de este analito. Para ello, se ha empleado *dodecilsulfato sódico (SDS)*, en una concentración 12 mM. Nuevamente se ha observado como a medida que se irradia se produce un incremento de la fluorescencia, incremento superior al que se produce en ausencia de agente tensoactivo (ver Figura V.31).

Finalmente, se ha estudiado que influencia puede ejercer la presencia de un agente oxidante en el proceso de irradiación. Para ello, se ha añadido a la muestra un volumen de disolución de H_2O_2 , de manera que la concentración final fuese de 0.043 mM. Se observa como se produce una disminución de la intensidad de fluorescencia, con respecto a los otros dos casos y, a medida que se incrementa el tiempo de irradiación, la fluorescencia desciende aún más. Este comportamiento puede ser observado en la Figura V.31.

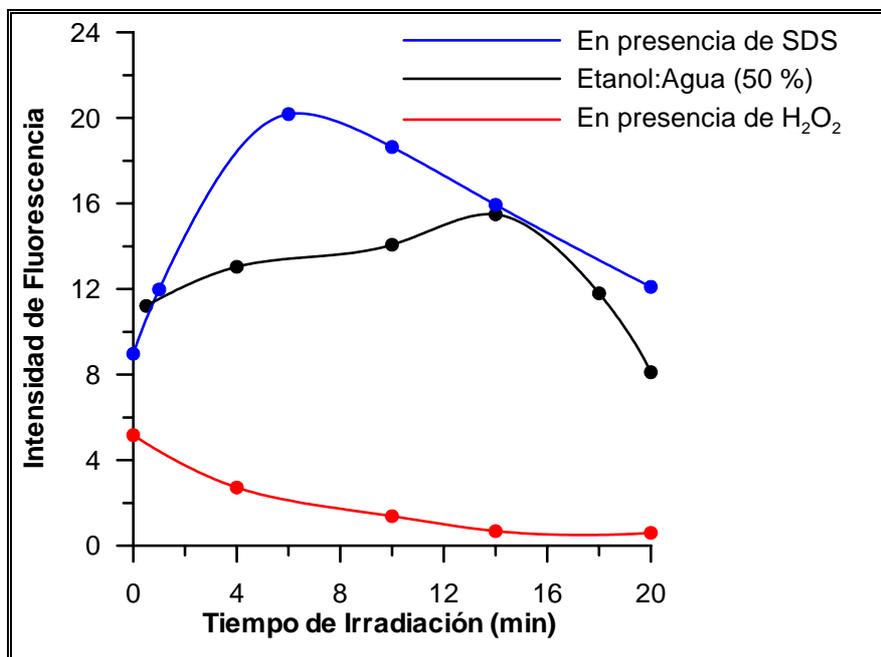


Figura V. 31. Influencia del el tiempo de irradiación en la intensidad de fluorescencia del CIPRO.

Influencia de la acidez del medio en el proceso de irradiación del ciprofloxacino

Al igual que para los casos anteriores, variaciones en la acidez del medio provocan cambios en la fluorescencia del analito; este hecho nos permite calcular los valores de las constantes de acidez de este compuesto. Ya se vio en el capítulo dos, como en un medio acuoso, los valores de pK eran de 6.02 y 8.58 respectivamente.

En un medio etanol agua, se procedió a estudiar como influye la acidez del medio en la formación del fotoproducto derivado del ciprofloxacino. Para ello a muestras conteniendo 100 ng/mL de ciprofloxacino se las modificó el pH por adición de volúmenes variables de ácido clorhídrico e hidróxido sódico de concentraciones adecuadas y una vez alcanzado el pH aparente deseado fueron irradiadas durante 5 minutos.

En la figura V. 32 se representa la variación de la intensidad de fluorescencia con el pH del medio, y como se puede observar a partir de pH 5 se produce un incremento notable de la intensidad, hasta alcanzar un máximo alrededor de un valor de pH de 6.3, para posteriormente disminuir.

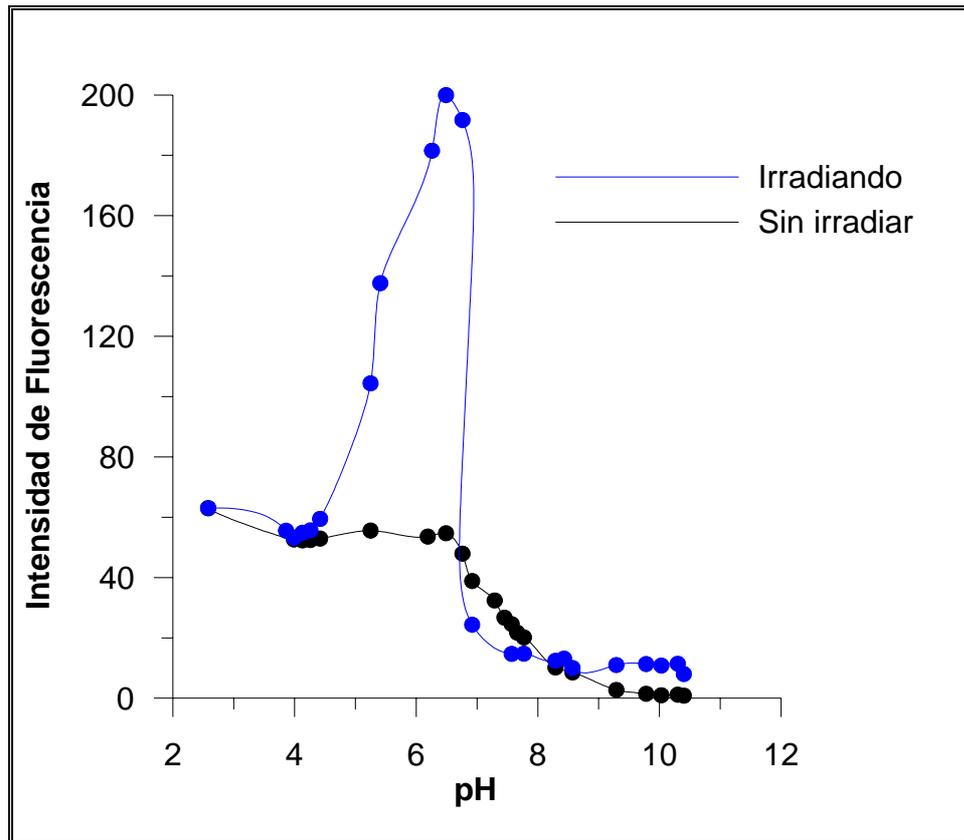


Figura V. 32.- Variación de la intensidad de fluorescencia para el Ciprofloxacino en función de la acidez del medio, sin irradiar e irradiando cinco minutos.

Podemos observar como la forma iónica que nos proporciona un mayor rendimiento del fotoproducto es aquella que se encuentra predominante alrededor de $\text{pH} = 6.3$. Como consecuencia podemos considerar la forma protonada como la generadora del CIPRO*.

En el siguiente gráfico podemos observar los espectros de excitación y emisión para el ciprofloxacino, irradiado y sin irradiar para los valores de pH 3, 6 y 10.

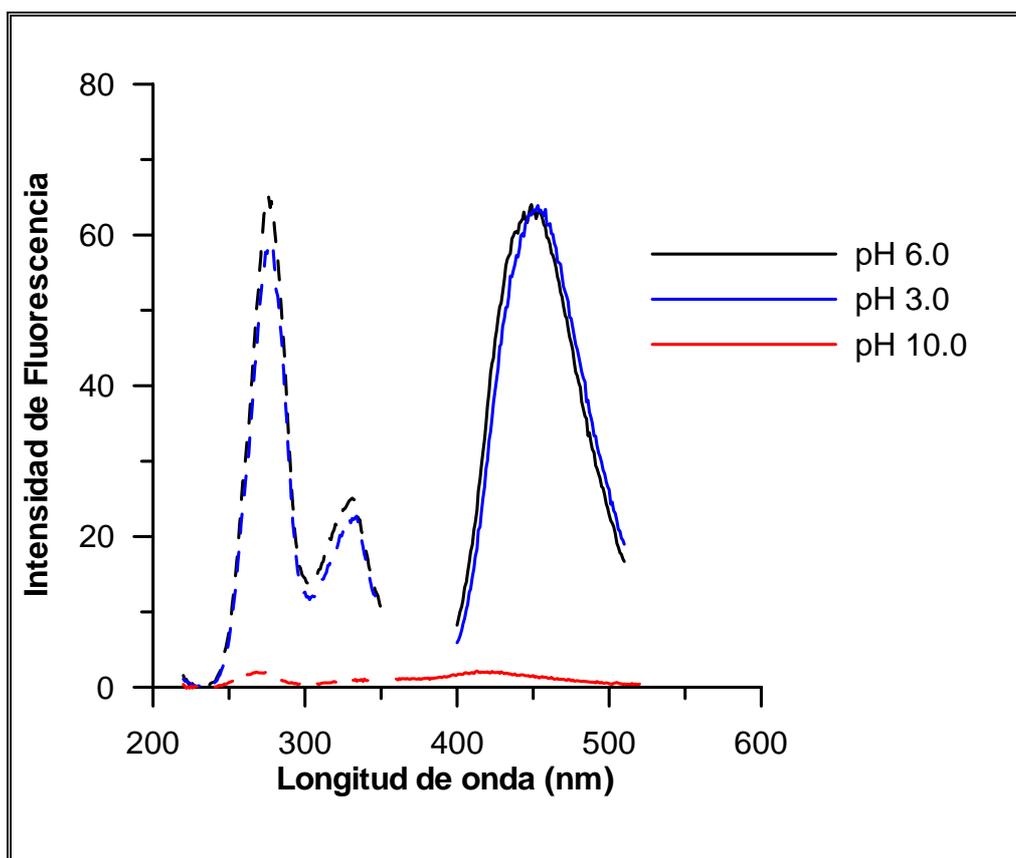


Figura V. 33.- Espectros de excitación y emisión para el ciprofloxacino sin irradiar en medio etanol-agua. [Cipro] =0.1 ng/mL.

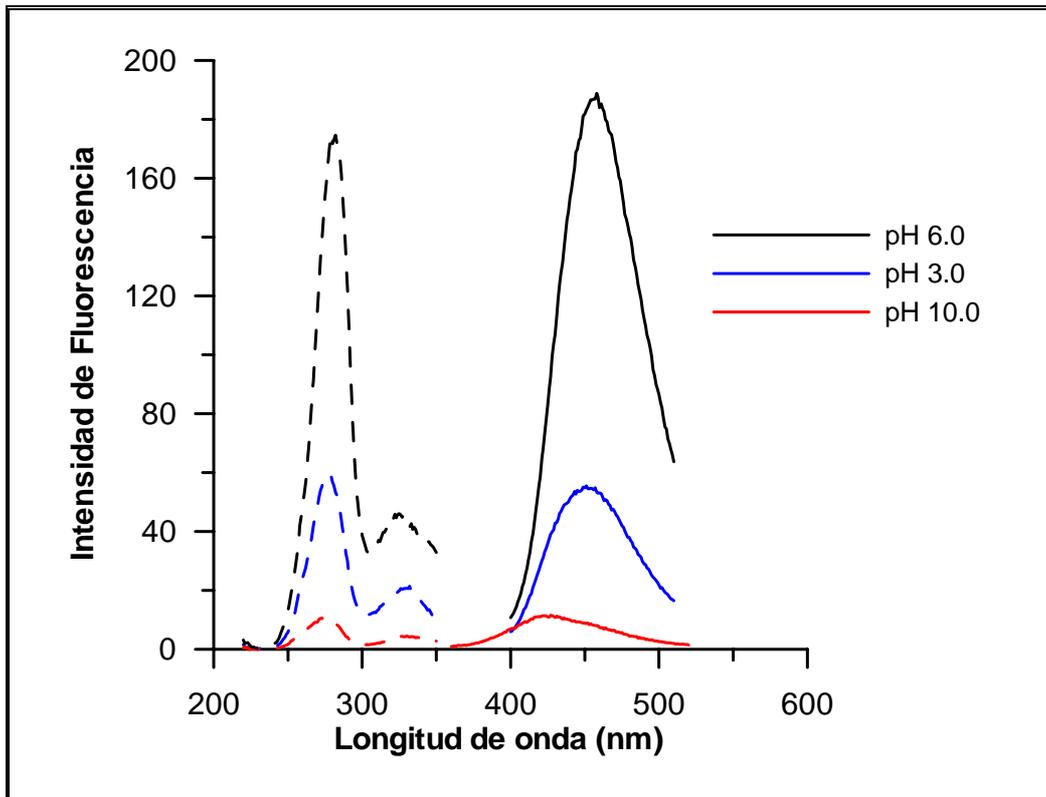


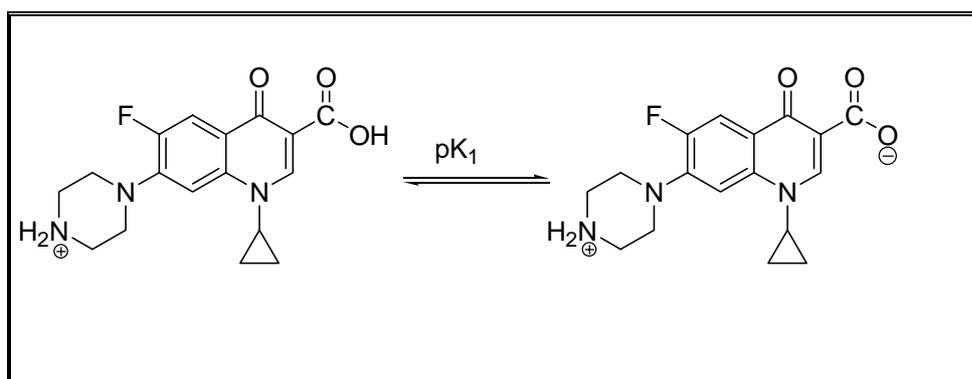
Figura V. 34.- Espectros de excitación y emisión para el CIPRO*.

Si comparamos los espectros antes de la irradiación (Figura V.33) con los que se obtienen después de la irradiación se puede observar, a diferencia de los casos anteriores, que no se producen grandes cambios en la morfología de los espectros. Tan solo observamos un importante incremento de la intensidad de fluorescencia.

Con objeto de establecer la posible naturaleza del fotoproducto originado se procedió a calcular los valores de pK del ciprofloxacino en la mezcla etanol agua al 50%, para compararlos con los del fotoproducto en el mismo medio. En la Figura V. 32 podemos observar la variación de la intensidad de fluorescencia a λ_{exc} 278 y λ_{em} 446 nm, en función del pH para el ciprofloxacino en medio hidroetanólico al 50 %.

El valor de pK calculado¹¹ es de 7.49. Recordemos que en el capítulo dos, se calcularon los valores de pK en medio acuoso, siendo 6.02 y 8.58 respectivamente. En medio etanol agua, observamos un desplazamiento debido a la mayor acidez de la mezcla etanol agua.

El equilibrio que podemos asociar a este pK sería:



El segundo posible pK₂ asociado a la desprotonación del grupo piperacínico no se llega a observar dada su debilidad como ácido en el medio hidroalcohólico.

Comportamiento ácido base del fotoproducto generado a partir del CIPRO.

Dado que la mayor intensidad de fluorescencia se obtiene a partir de disoluciones neutras de ciprofloxacino, a pH próximos a 6.5, se procedió a generar el fotoproducto para, una vez alcanzado el equilibrio, establecer las propiedades ácido base del mismo.

De este modo, a muestras de ciprofloxacino a pH 6.7 e irradiadas durante 5 minutos, se las modificó el pH adicionando los volúmenes correspondientes de disoluciones de hidróxido sódico y ácido clorhídrico, respectivamente. En este proceso, no se producen cambios significativos en la morfología de los espectros, tan solo variaciones en la intensidad de fluorescencia.

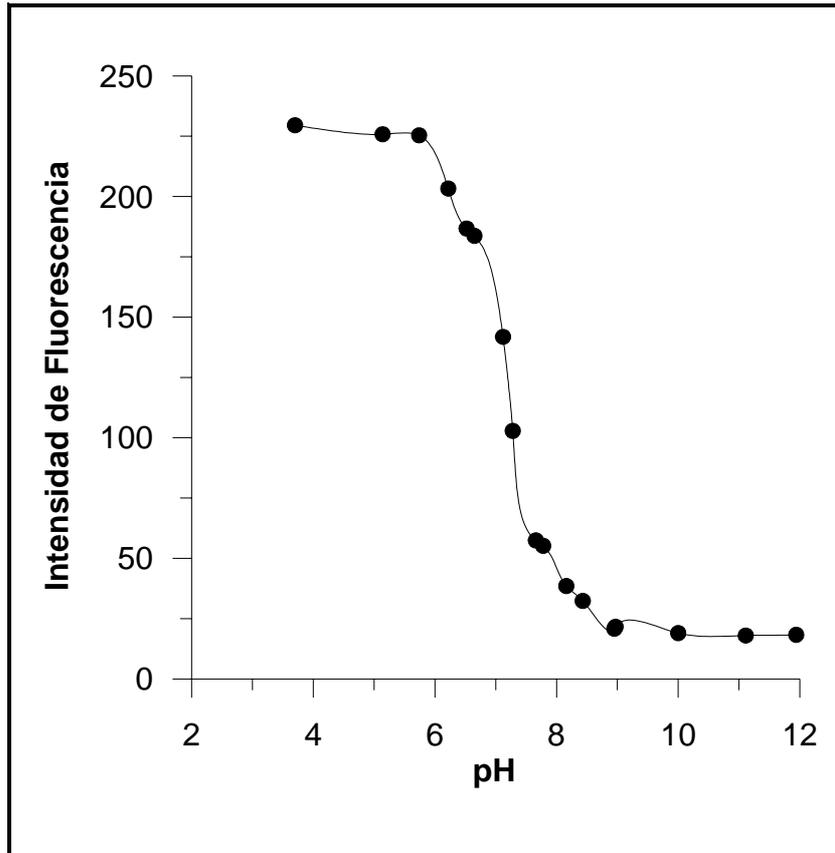
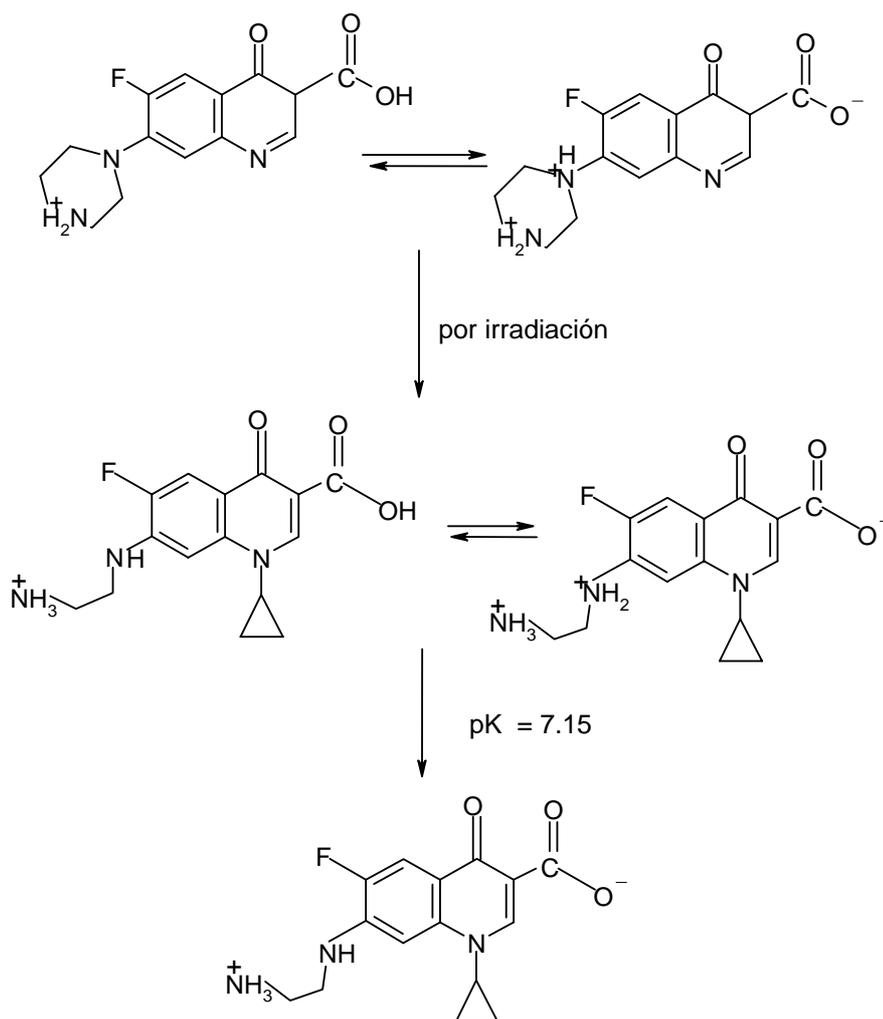


Figura V. 35.- Influencia del pH en la intensidad de fluorescencia del CIPRO*.

Con los resultados aquí representados podemos llevar a cabo el cálculo de la correspondiente constante de acidez. Gráficamente podemos observar un único cambio, próximo a pH neutros. El valor calculado¹¹ es de 7.15.



Una vez establecidas las características fluorescentes del fotoproducto en función de la acidez del medio, se ha estudiado como influye el tiempo de irradiación al pH seleccionado como óptimo. Para ello, se fijó la acidez inicial en 6.5 y se irradió la muestra durante diferentes tiempos. Se pudo observar como, a medida que se incrementa el tiempo de irradiación, se produce un aumento en la fluorescencia, hasta llegar a un valor a partir del cual la fluorescencia se hace independiente del tiempo de irradiación.

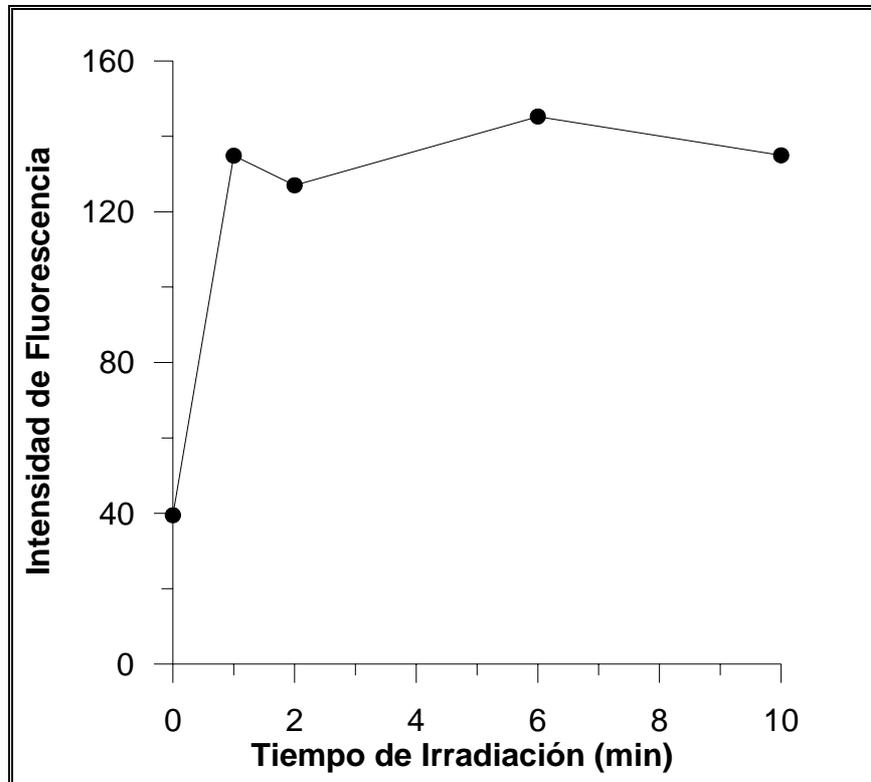


Figura V. 36.- Influencia del tiempo de irradiación sobre la señal fluorescente del CIPRO* ($\lambda_{\text{ex}} = 278 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 440 \text{ nm}$).

Recta de calibrado para la determinación de CIPRO mediante fotoinducción

Fijando un tiempo de irradiación de cinco minutos y un pH = 6.5 mediante la adición de tampón Tris/HCl (0.75 mM), se estudió la relación entre la señal obtenida y la concentración de ciprofloxacino inicial. Para ello, se registraron por triplicado diferentes patrones de concentraciones comprendidas entre 10 y 100 ng/mL de ciprofloxacino. El potencial del detector fue fijado en 600 V y las rendijas de excitación y emisión en 4 nm. El monocromador de excitación se fijó en 282 nm y el de emisión a 440 nm.

El ajuste lineal por el método de mínimos cuadrados, permitió calcular la ecuación de la línea recta que mejor se ajusta a los puntos experimentales.

Cuando se establece la precisión del método calculando la repetitividad en un mismo día (n=10) y en días diferentes (n=10) se obtiene valores de desviación estándar en los resultados de 2.01 ng mL⁻¹ y de 2.31 ng mL⁻¹, respectivamente.

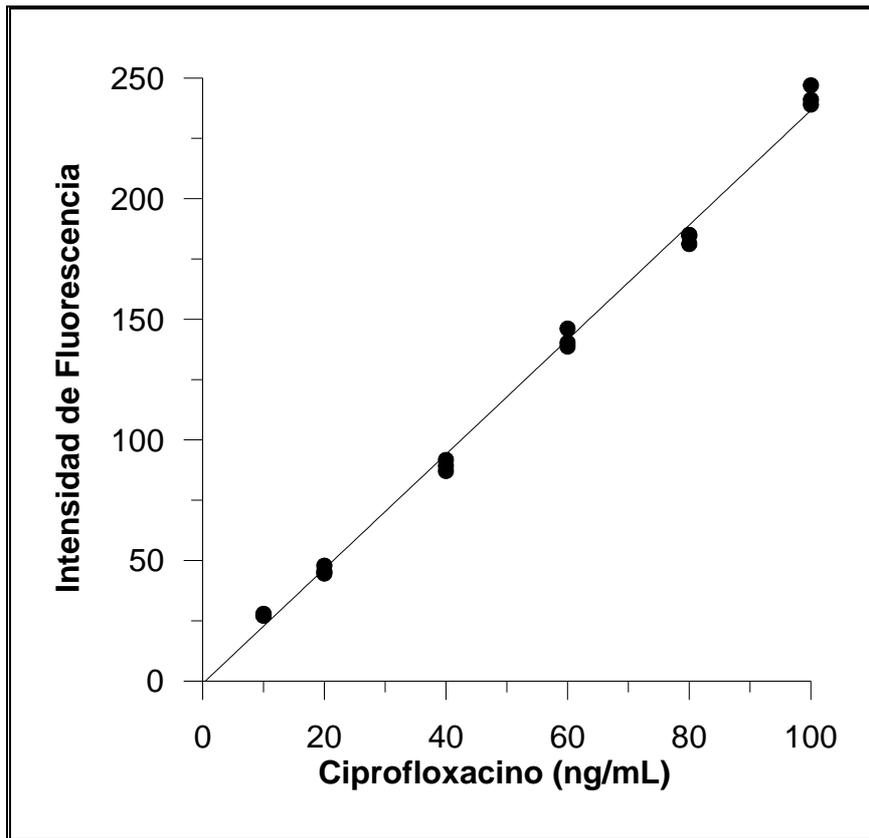


Figura V. 37.- Recta de calibrado para la determinación de CIPRO mediante fluorescencia inducida fotoquímicamente.

Tabla V. 10. Parámetros estadísticos obtenidos para la calibración de CIPRO.

	Ciprofloxacino
Ordenada Origen (So)	-1.02±2.28
Pendiente (UF.mL/ng) (Sp)	2.37±0.03
Coef. Regresión	0.998
S (R,c)	5.08
Linealidad (%)	98.4
Límite de detección Clayton (ng/mL) $\alpha = \beta = 0.05$	5.38
Límite de detección Winefordner y Long (k=3) (ng/mL)	2.88
Sensibilidad (ng/mL)*	2.13

* expresada como γ^{-1}

2.5. Efectos de la irradiación UV en las características luminiscentes del enrofloxacin.

Se han empleado disoluciones de enrofloxacin de concentración 10.0 ng/mL y condiciones instrumentales similares a las empleadas en los estudios anteriormente descritos.

Para este analito se han realizado estudios semejantes a los descritos en casos anteriores. En primer lugar, se establece como adecuada la composición del disolvente en 50 % etanol agua; ya que estas eran las condiciones favorables para el enoxacin, analito que presenta menor sensibilidad.

Comprobamos como la irradiación produce un efecto favorable en la fluorescencia de este analito. Se ha estudiado como influye la presencia de un agente tensoactivo y oxidante en las propiedades luminiscente del enrofloxacin al ser irradiado, comprobándose que no se producen notables efectos.

Con el fin de determinar las condiciones de acidez adecuadas para la irradiación, se estudió la influencia que ejerce la acidez del medio en el proceso de irradiación.

Influencia de la acidez del medio en el proceso de irradiación del enrofloxacin.

A partir de una disolución de enrofloxacin, de concentración 100 ng/mL, se modificó el pH aparente mediante la adición de volúmenes adecuados de disolución de hidróxido sódico y ácido clorhídrico; registrando los espectros de fluorescencia para cada valor de pH. En la Figura V. 38 se representa la influencia del pH en la influencia del pH en la intensidad de fluorescencia del enrofloxacin en medio hidroetanólico.

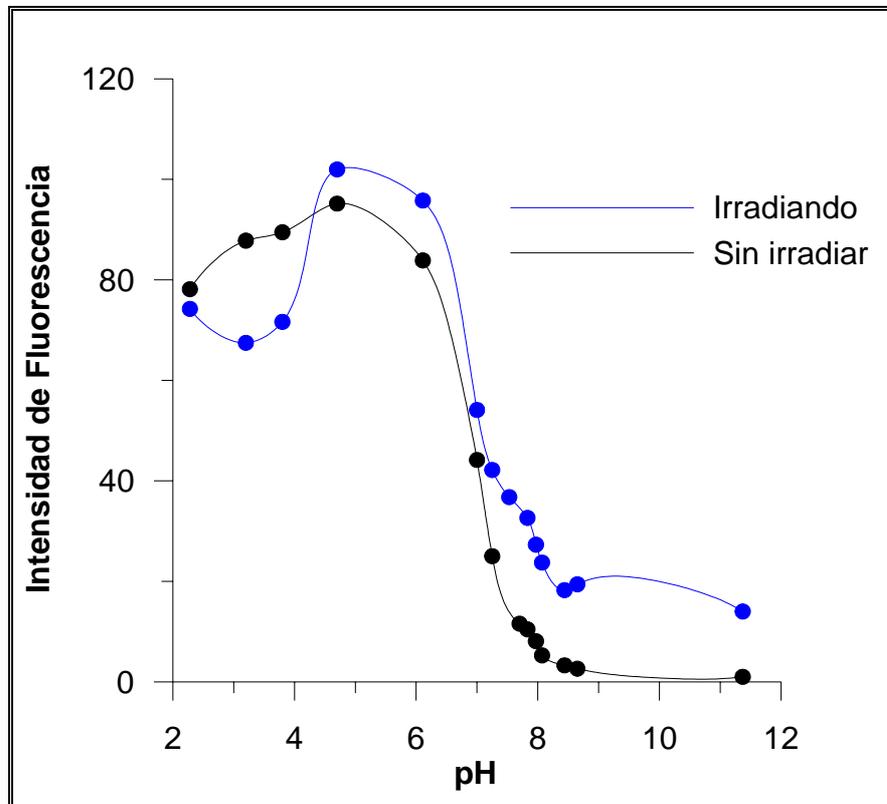


Figura V. 38.- Influencia del pH en la intensidad de fluorescencia del enrofloxacin en medio hidroetanólico.

De acuerdo a los datos anteriores, podemos calcular el valor de la constante de acidez, en medio etanol agua. El valor calculado es de 6.84; lo cual corresponde con la desprotonación del grupo carboxílico, que en medio etanol agua se ha desplazado a pH mayores, de forma análoga a lo que sucedía en los casos anteriores.

De acuerdo con la figura anterior, la forma más adecuada para generar el fotoproducto, es aquella en la que el analito se encuentra en un pH próximo a la neutralidad. De modo que, al igual que en los otros casos, fijamos inicialmente la acidez del medio en un valor óptimo de 6.5.

Comportamiento ácido-base del fotoproducto generado a partir del enrofloxacin.

En estudios cromatográficos, se ha visto como al irradiar el enrofloxacin, no se obtiene un único fotoproducto, sino que han sido separados varios fotoproductos (ENRO*). Es por eso por lo que no proponemos el cálculo de las constantes de acidez de los fotoproductos. Pero, para caracterizar las propiedades fluorescentes de la reacción, se ha estudiado como varía la fluorescencia en función de la acidez del medio, una vez que se han generado los fotoproductos irradiando a pH 6.5.

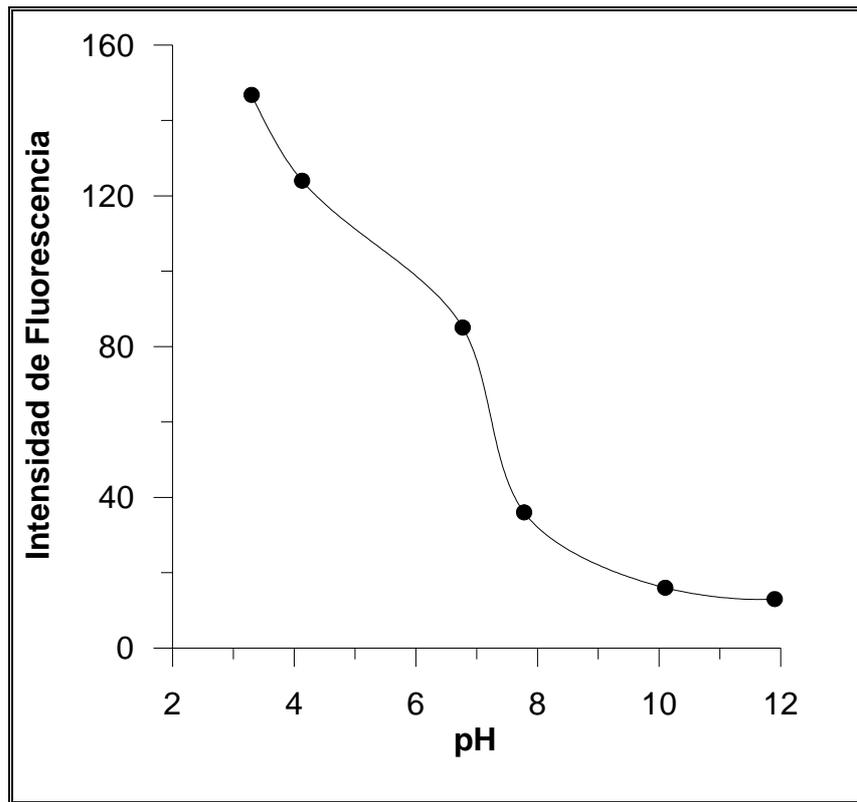


Figura V. 39.- Influencia del pH en la intensidad de fluorescencia del ENRO*.

Como podemos observar en la Figura V. 35, la mayor intensidad de fluorescencia se obtiene en medio ácido. De manera que, al igual que se realizó en los casos anteriores; la mayor sensibilidad se logra cuando se genera el fotoproducto a un pH próximo a la neutralidad y, posteriormente, se mide su fluorescencia a valores de pH próximos a cuatro. Con objeto de seguir una sistemática similar a los casos estudiados anteriormente, se fijó el pH para medir la fluorescencia de los fotoproductos en 4.

Recta de calibrado para la determinación del ENRO mediante fotoinducción

Fijando un tiempo de irradiación de cinco minutos, al igual que en los analitos anteriores; se ha estudiado la relación que existe entre la concentración de ENRO y la señal obtenida. Para ello, se registraron por triplicado diferentes patrones de concentraciones comprendidas entre 10 y 100 ng/mL. Las condiciones instrumentales se fijaron con los mismos parámetros que en los cuatro casos anteriores. Realizando el ajuste lineal, mediante la aplicación de ajustes por mínimos cuadrados, siguiendo la sistemática indicada en los casos anteriores, obtenemos los siguientes resultados.

Figura V. 40.- Recta de calibrado para enrofloxacin.

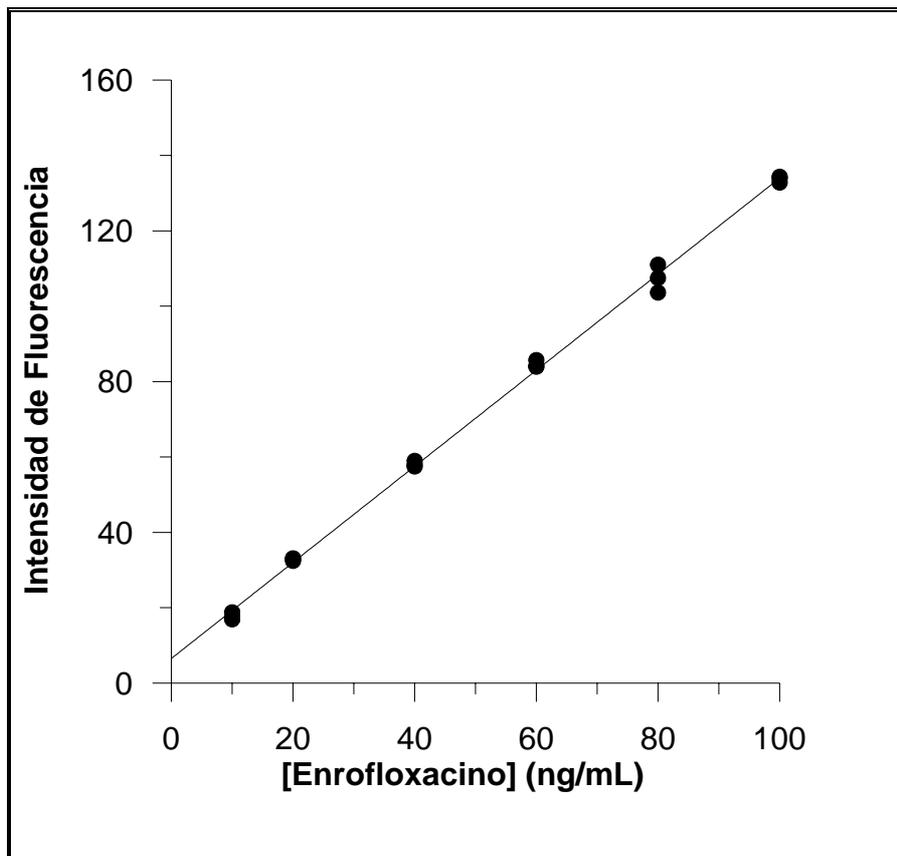


Tabla V. 10.- Parámetros del ajuste lineal y de calidad para la irradiación del enrofloxacino

	Enrofloxacino
Ordenada Origen (So)	1.27±0.01
Pendiente (ng/mL) (Sp)	6.50±0.84
Coef. Regresión (r)	0.999
S (R,c)	1.87
Linealidad (%)	98.9
Límite de detección Clayton (ng/mL) $\alpha = \beta = 0.05$	2.67
Límite de detección Winefordner y Long (k=3) (ng/mL)	1.99
Sensibilidad (ng/mL)*	1.47

* Expresada como γ^{-1}

Se ha estudiado la repetitividad de las señales dentro de un mismo día y en días diferentes. Se observa una desviación estándar en los resultados de 2.73 ng/mL para un mismo día (n=10) y, para días diferentes, de 2.77 ng/mL.

3. Estudios cromatográficos preliminares para la caracterización de los fotoproductos generados en los procesos de irradiación de fluoroquinolonas.

Como se ha expuesto anteriormente, el norfloxacin al ser irradiado, mediante una fuente de irradiación externa de alta intensidad, produce una reacción fotoquímica, originando un fotoproducto, con un rendimiento cuántico de fluorescencia superior al producto inicial.

Con objeto de clarificar si es un único producto o varios los productos generados en la fotoreacción, se ha realizado un seguimiento cromatográfico del proceso.

Para ello, partiendo de datos bibliográficos³, se aplicó un procedimiento encaminado a separar el producto inicial de su fotoproducto o fotoproductos.

Las condiciones experimentales que se establecieron en los apartados anteriores para la generación del o los fotoproductos eran las siguientes:

- Preparar la muestra en un medio hidroalcohólico al 50%
- Fijar la acidez del medio en 6.5 mediante la adición de disolución buffer Tris/HCl

En estas condiciones se lleva a cabo la irradiación. El tiempo óptimo fue fijado en 5 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, se demostró que la forma ácida del fotoproducto es la que presenta mayor fluorescencia, por ello, una vez irradiado se baja el pH hasta un valor de 4.0 mediante la adición de 20 μ L de ácido clorhídrico de concentración 0.1 M.

En el trabajo de referencia, indicado anteriormente, la fase móvil que se emplea esta constituida por un tampón fosfato, de composición 20 mM de ácido fosfórico y 2.5 mM de un formador de pares iónicos (ácido 1-heptanosulfónico, en su forma de sal sódica al 98 %) y acetonitrilo en proporción de 15/85 acetonitrilo/tampón (v/v), y el flujo empleado de 1.5 mL/min.

Con objeto de aplicar estos resultados a nuestros estudios, se llevo a cabo una modificación, que nos permitió ajustar dichos parámetros cromatográficos. Así, se utilizó un flujo de 1.0 mL/min, y una fase movil similar a la descrita pero conteniendo una proporción ligeramente superior de acetonitrilo. Concretamente la composición de la fase móvil fue de 18/82, acetonitrilo/ tampón.

En estas condiciones se generará una separación favorecida por la formación de pares iónicos con las fluoroquinolonas y el agente formador de pares iónicos y también con el fotoproducto, previsiblemente cargado positivamente, y el agente formador de pares iónicos, aumentando así la discriminación entre fluoroquinolonas y fotoproductos.

Comportamiento cromatográfico de las disoluciones de Norfloxacin

Cuando se inyecta en el sistema cromatográfico una muestra conteniendo 75 ng mL^{-1} de NOR se observa un pico a tiempos de aproximadamente 6 minutos, así como una amplia señal correspondiente al frente. En la figura V. 41 se pueden observar los cromatogramas correspondientes a un blanco sin NOR y a una muestra conteniendo NOR.

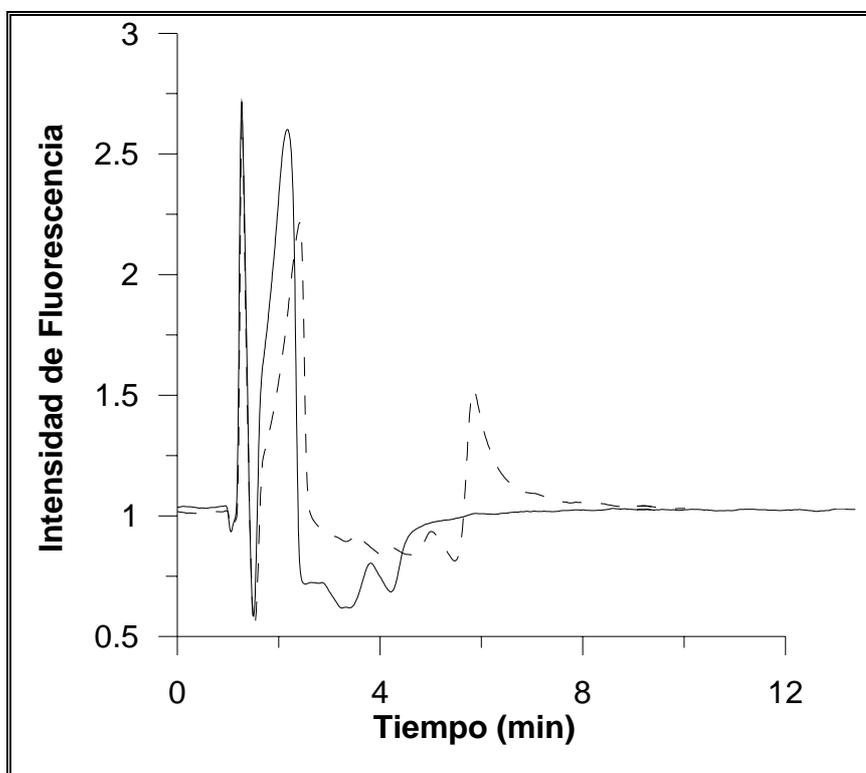


Figura V. 41.- Cromatogramas de una muestra de blanco (—) y de una muestra conteniendo 75 ng mL^{-1} de NOR.

Podemos observar que los dos picos iniciales son comunes en ambos cromatogramas, por lo que descartamos que sean producidos por el norfloxacin.

Con el objeto de determinar si es uno, o son varios los productos observados se realizan varios espectros de emisión fluorescente ($\lambda = 277$ nm) en el pico correspondiente al NOR a distintos tiempos. Se puede observar en la Figura V. 42 como todos presentan una forma similar y λ_{em} a 444 nm correspondiente a la emisión de disoluciones de norfloxacin.

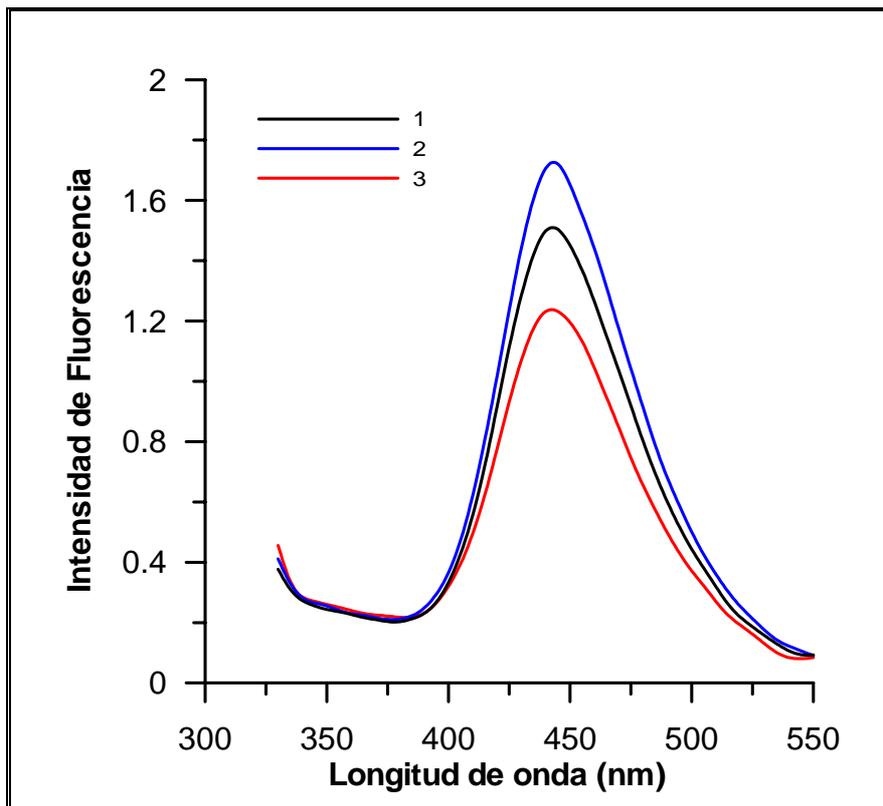


Figura V. 42.- Espectros de emisión obtenidos en el pico del NOR en la subida (1), máximo (2) y bajada del pico (3).

A continuación, se irradió una muestra de NOR, durante quince minutos, y se registró su cromatograma. Al compararlo con el cromatograma del norfloxacin puro, se observa como aparece un nuevo pico, de mayor intensidad y situado a tiempos menores ($t = 3.38$ min) que previsiblemente debe corresponder al fotoproducto. Este pico es simétrico y de elevada intensidad. Como se ha indicado anteriormente en este capítulo, el fotoproducto obtenido debería ser una especie más polar que el propio NOR y cargada positivamente al $\text{pH}=4$ fijado como de trabajo. La formación del correspondiente par iónico, por tanto, adelanta notablemente la aparición del fotoproducto.

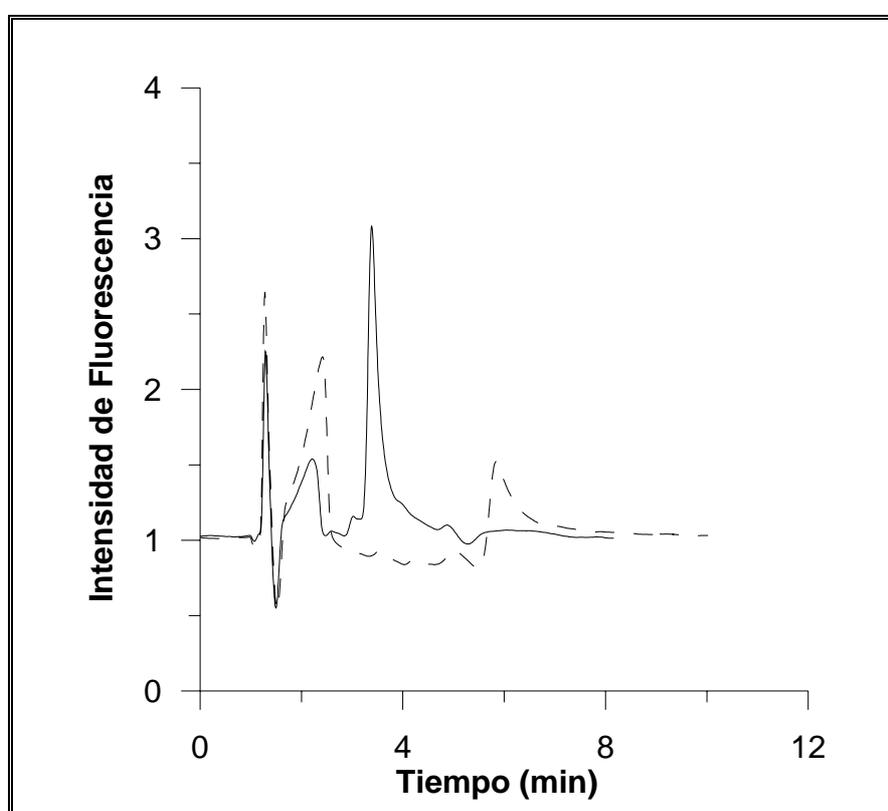


Figura V. 43.- Cromatograma del NOR inicial (-----) y su NOR* (—).

Si analizamos los espectros en el máximo del pico, y a tiempos superiores e inferiores, podemos observar como son muy similares (Figura V.).

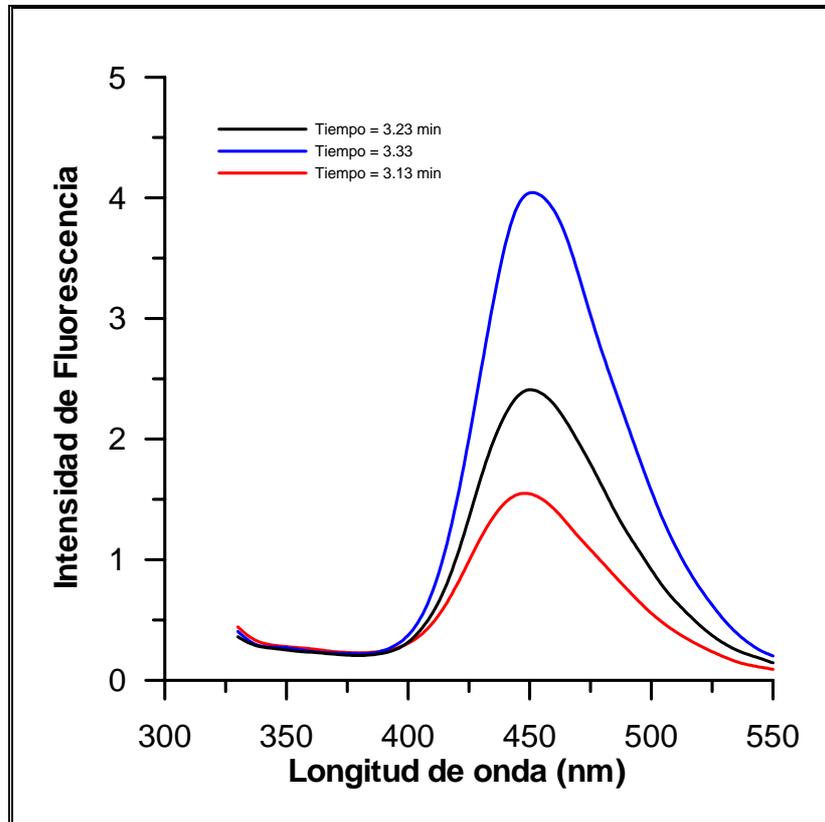


Figura V. 44.- Espectros de emisión obtenidos en el pico del NOR* a diferentes tiempos.

Se aprecia como existe un pequeño desplazamiento entre los espectros del fotoproductos en función del tiempo. Podemos observar, que con respecto a los espectros del norfloxacino, el fotoproducto presenta su máximo de emisión a longitudes de ondas mayores.

Finalmente, se ha estudiado la variación de los cromatogramas, en función del tiempo de irradiación. En la figura V. 45 se observa la evolución del área de pico. Los cromatogramas presentan siempre un perfil similar aumentando el pico correspondiente al fotoproducto a medida que aumenta el tiempo de irradiación, hasta aproximadamente 4 minutos. A tiempos superiores 10 minutos se observa un ligero incremento del área de pico que podría indicar una reacción secundaria.

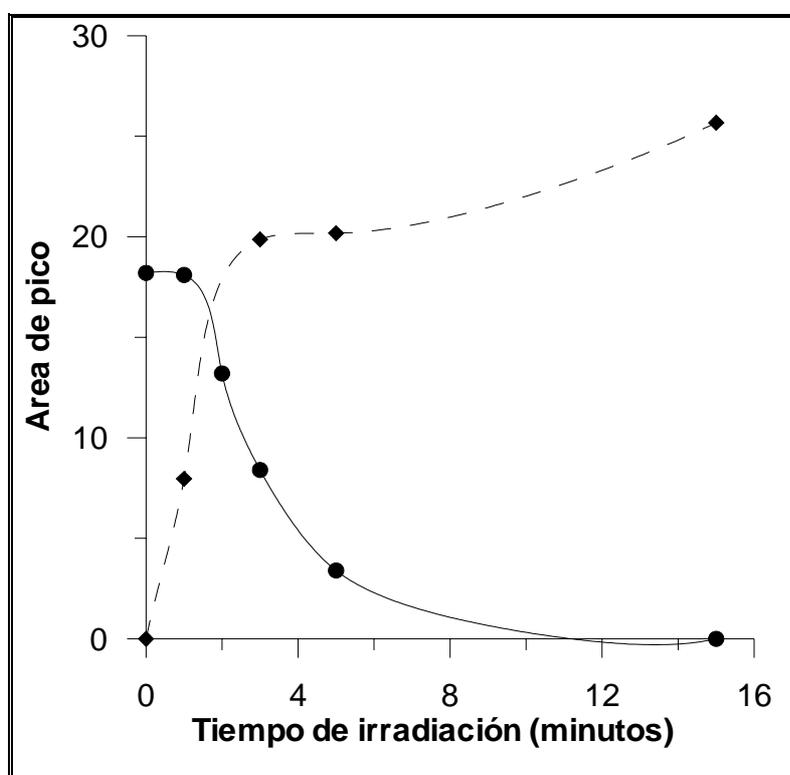


Figura V.45.-Variación del área de pico para NOR (—) y su NOR* (---) en función del tiempo de irradiación.

Comportamiento cromatográfico de las disoluciones de Enoxacino

Como se indicó anteriormente la fluorescencia que presenta este principio activo, en el medio hidroalcohólico utilizado, es muy baja, sin embargo su fotoproducto presenta un rendimiento cuántico de fluorescencia considerablemente superior.

El seguimiento cromatográfico del proceso de irradiación muestra que cuando el ENO ha sido irradiado aparece un nuevo pico a 2.9 minutos muy intenso comparado con el ENO sin irradiar.

En la Figura V.46 podemos observar los correspondientes cromatogramas

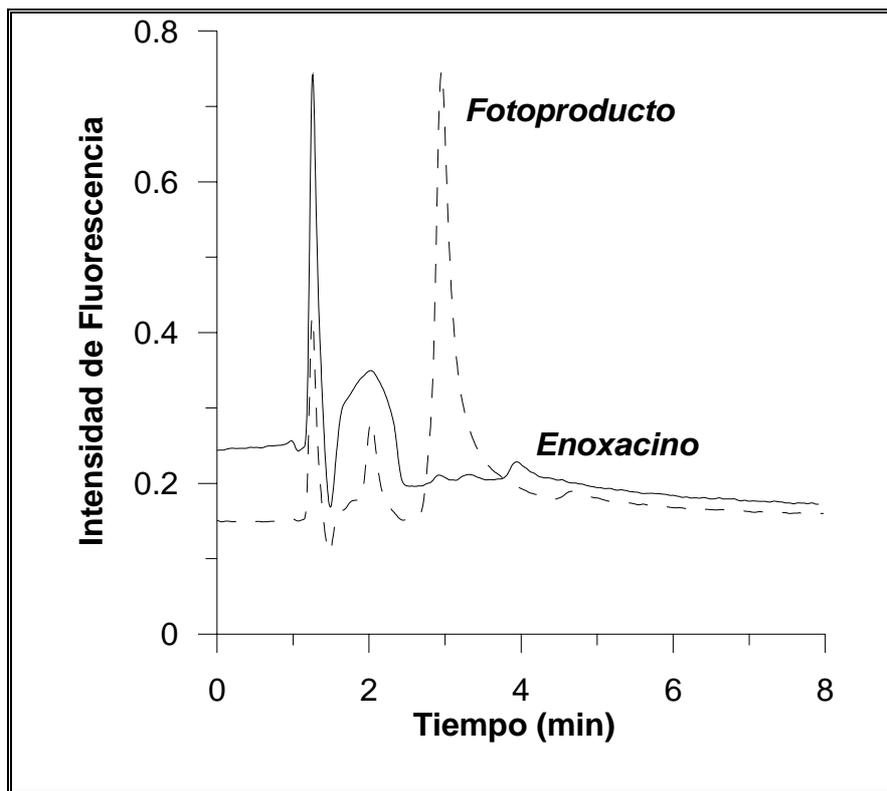


Figura V. 46.- Cromatogramas obtenidos para una muestra de ENO (—) y del correspondiente ENO* (----).

El fotoproducto presenta un espectro de emisión ($\lambda_{exc} = 267 \text{ nm}$) con un λ_{em} a 420 nm, desplazado hipsocromicamente con respecto al del ENO cuyo $\lambda_{em} = 440 \text{ nm}$.

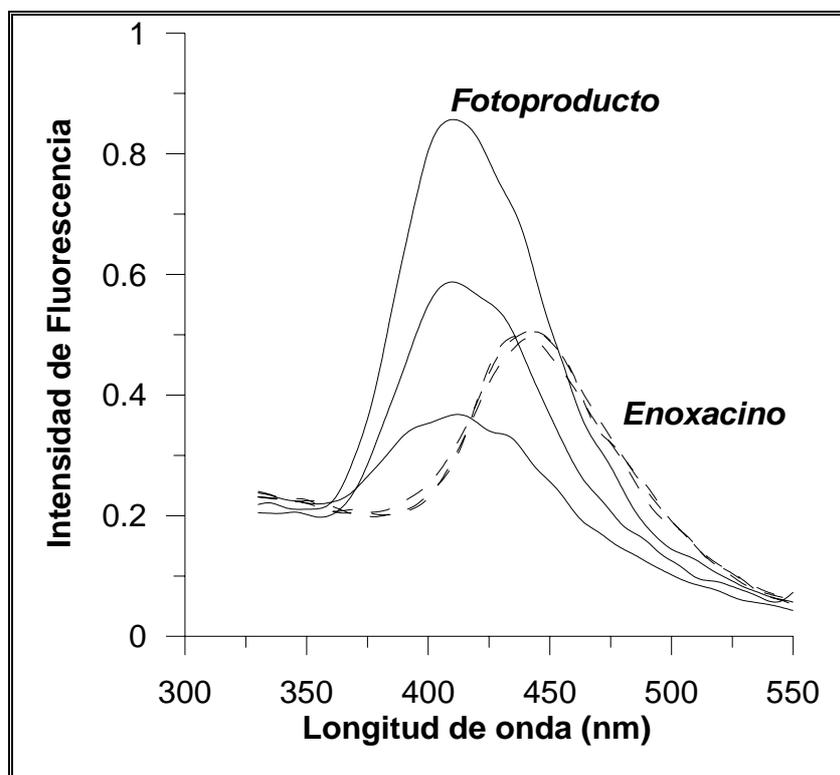


Figura V. 47.-Espectros de emisión (—) obtenidos en el pico del ENO* y del ENO (----).

Cuando se realiza un seguimiento cromatográfico en función del tiempo de irradiación, puede observarse (Figura V.48) como entre aproximadamente 5 y 8 minutos el área del pico del fotoproducto es máxima disminuyendo progresivamente a medida que aumenta el tiempo de irradiación, mientras que la señal del ENO, ya muy pequeña originariamente, prácticamente desaparece.

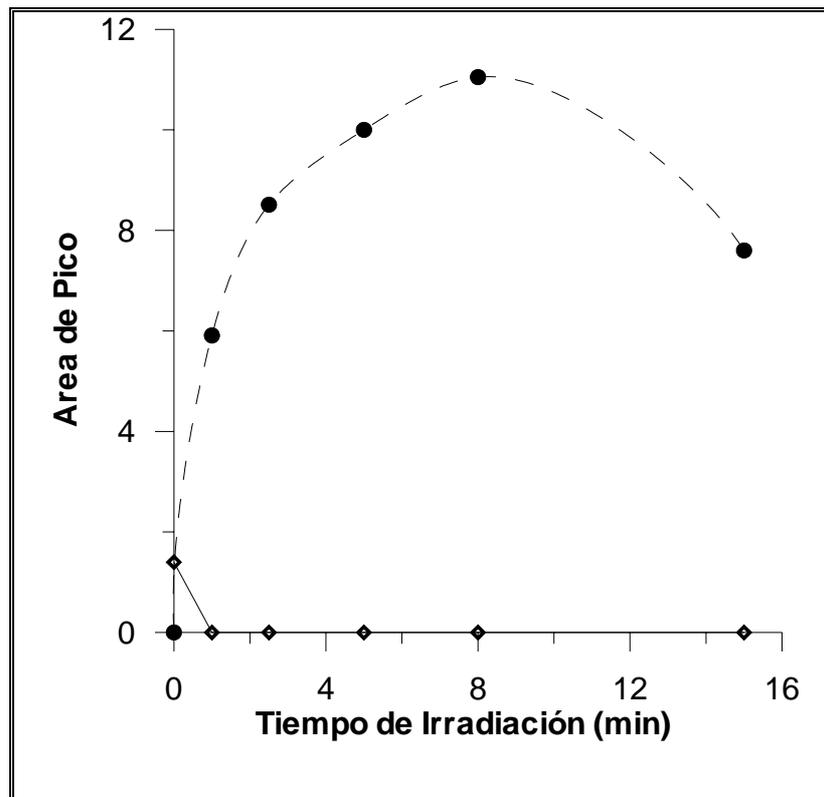


Figura V. 48. Influencia del tiempo de irradiación en el área de pico del fotoproducto (----) y del ENO (—).

A un tiempo de 5 minutos seleccionado en los estudios previos como óptimo para llevar a cabo el proceso de irradiación, el pico obtenido está bien definido y presenta una intensidad de fluorescencia elevada y prácticamente máxima.

Comportamiento cromatográfico de las disoluciones de Ofloxacin

Del mismo modo que los dos principios activos anteriores, se han realizados estudios cromatográficos con objeto de determinar los fotoproductos de la reacción. En estudios anteriores, se observó como el ofloxacin no presentaba variaciones en sus propiedades fluorescentes al ser irradiado.

En la siguiente figura podemos observar el cromatograma del ofloxacin sin ser irradiado e irradiado, observándose que no existen diferencias entre ambos registros.

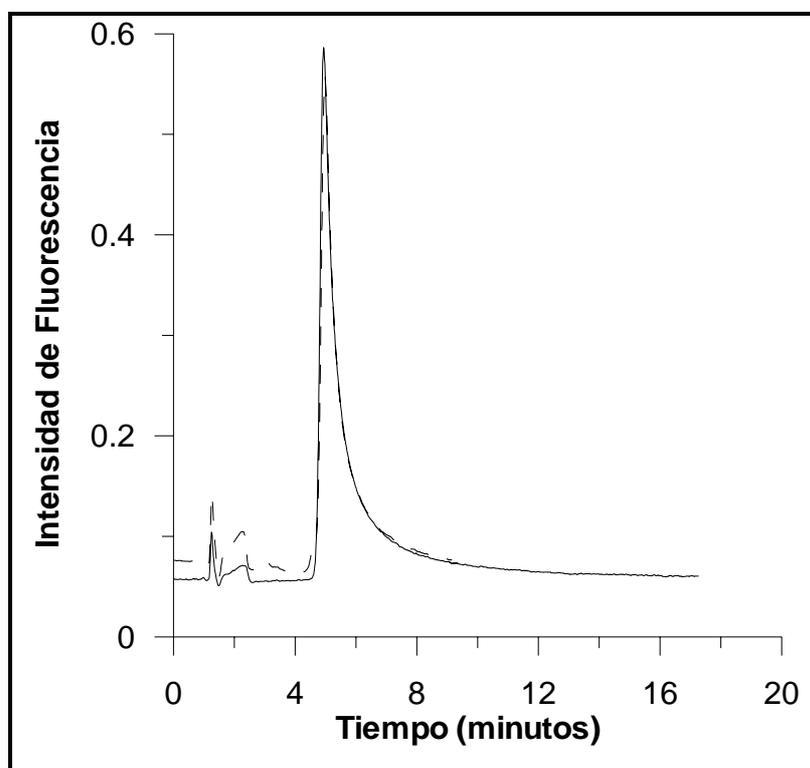


Figura V. 49. Cromatograma de disoluciones de ofloxacin con y sin irradiación.

En la figura anterior se obtienen cromatogramas idénticos a partir de muestras irradiadas y sin irradiar, en concordancia con lo observado en los estudios anteriormente descritos para esta fluoroquinolona en esta memoria.

Podemos concluir que, de los estudios cromatográficos llevados a cabo, tanto ENO como NOR mediante irradiación dan lugar a un producto mayoritario intensamente fluorescente, mientras que OFLO no se altera en las condiciones empleadas. Resultados similares se han encontrado para CIPRO y ENRO, que al igual que ENO y NOR, dan lugar a un producto mayoritario tras la irradiación.

Modificación de las condiciones experimentales

Con objeto de mejorar la definición de los picos para los analitos estudiados, se procedió a la optimización de un procedimiento cromatográfico. Estos estudios se abordarán con detalle en el capítulo VII de esta memoria. A modo de resumen diremos aquí, que la fase móvil optimizada presenta una composición tampón fosfato, 30 mM, y THF (96:4). En las siguientes figuras se recogen los diferentes cromatogramas para las fluoroquinolonas estudiadas, irradiadas y sin irradiar (figuras V.50 a V. 54). En todos los casos aparecen picos bien definidos, observándose en el caso del ENRO* la posible aparición de varios productos.

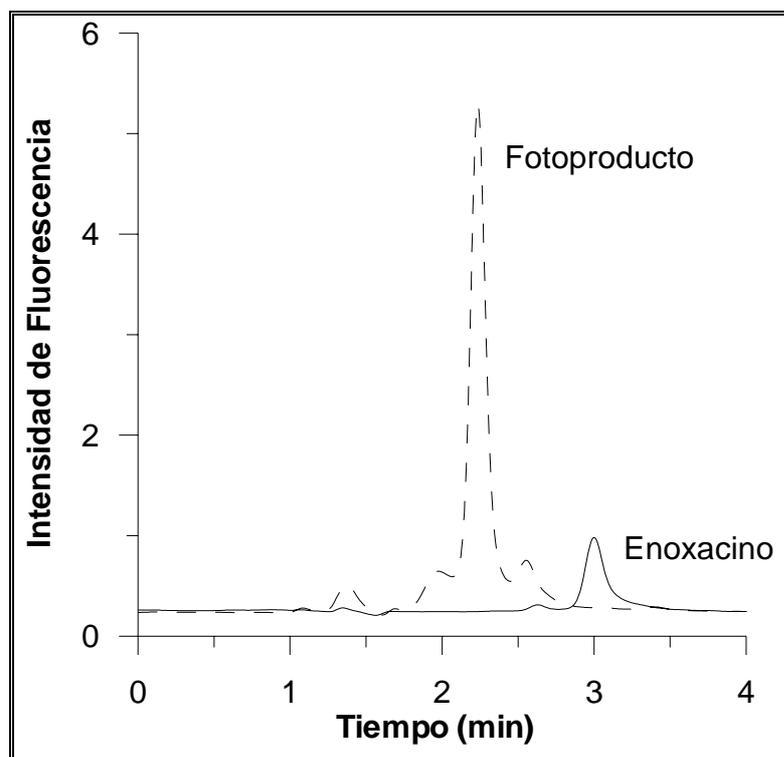


Figura V. 50. Cromatograma correspondiente a ENO y ENO*.

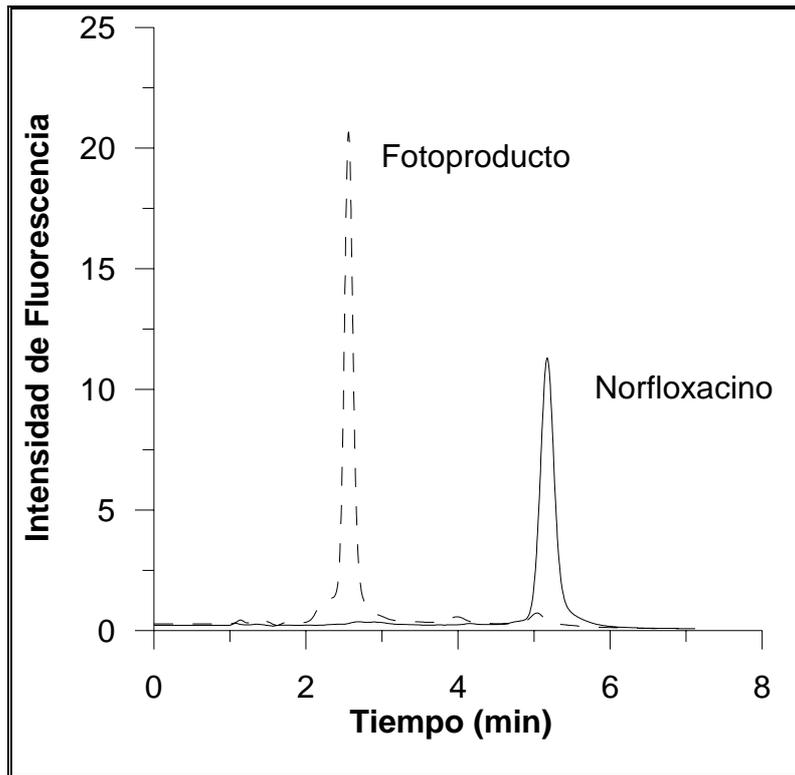


Figura V.51. Cromatograma de NOR y NOR*.

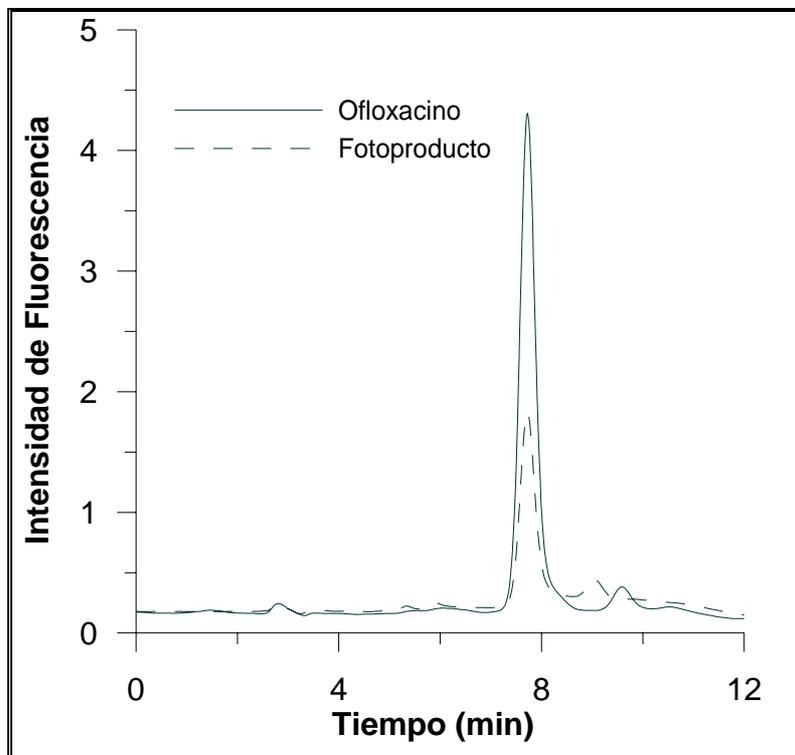


Figura V. 52. Cromatograma para el OFLO irradiado y sin irradiar.

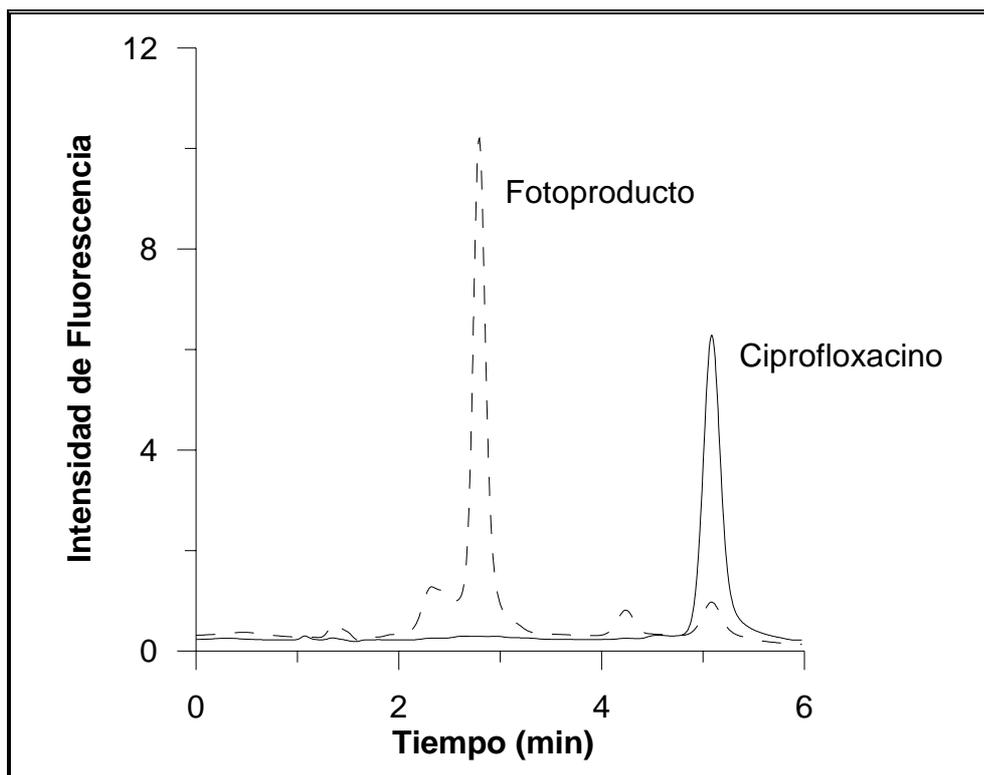


Figura V. 53.- Cromatograma para el Ciprofloxacino y su fotoproducto

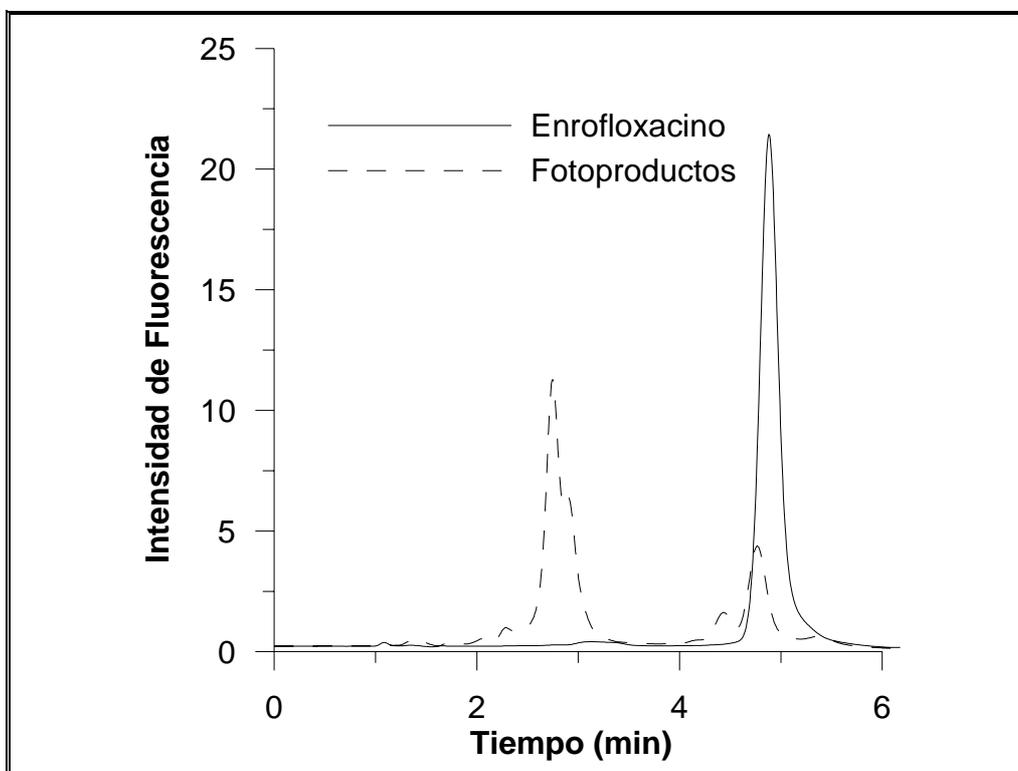


Figura V. 54.- Cromatograma de enrofloxacin y sus fotoproductos

4. Breve resumen de las conclusiones más destacables de este capítulo.

A partir de los resultados obtenidos en el cálculo de los valores de pK en medio acuoso, en medio hidroetanólico y en medio hidroetanólico previa irradiación, se han elaborado las siguientes conclusiones:

a) Los valores de pK calculados en medios hidroetanólicos son ligeramente mayores que los encontrados en agua. No se observa el pK correspondiente a la desprotonación del nitrógeno piperacínico para el NOR, OFLO, CIPRO y ENRO.

b) Los fotoproductos generados para ENO (ENO*), NOR (NOR*) y CIPRO (CIPRO*) presentan valores de pK concordantes con la existencia del grupo carboxílico en la molécula. Además, en el caso del NOR*, se observa también un nuevo pK a valores menores, concordantes con la desprotonación de un grupo amino primario sustituido en el anillo aromático.

c) El fotoproducto generado a partir del CIPRO (CIPRO*) presenta características ácido base similares a las obtenidas a partir del ENO*. En ambos casos, los fotoproductos generados parecen corresponder a los correspondientes derivados de la etilendiamina.

En cuanto a los parámetros analíticos relativos a sensibilidad, podemos comparar aquellos obtenidos en medio micelar con los de los correspondientes fotoproductos:

a) La sensibilidad de calibración (UF.mL ng^{-1}) aumenta drásticamente para ENO y CIPRO previa irradiación, y aumenta notablemente para el NOR. Igual comportamiento se podría exponer respecto al LD en la mayoría de los casos.

b) Sin embargo, el NOR* no arroja un aumento de sensibilidad de calibración y el LD se ve desfavorecido respecto al medio micelar.

En cuanto a la influencia de las características estructurales en la formación de los fotoproductos:

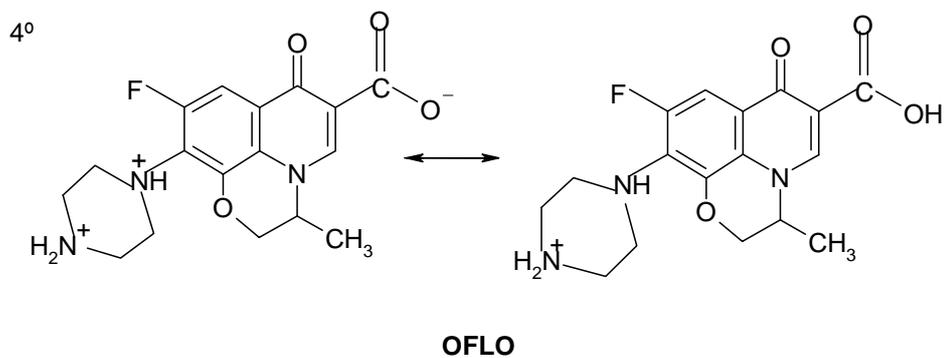
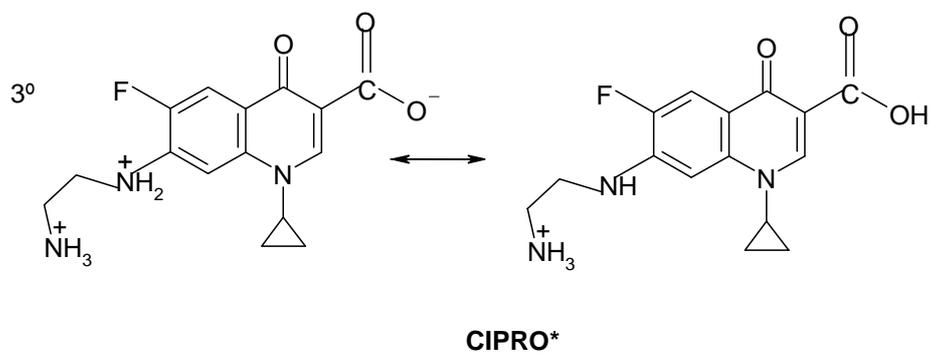
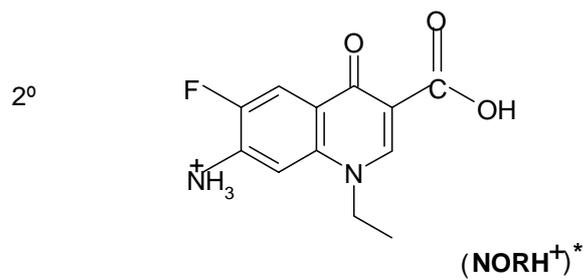
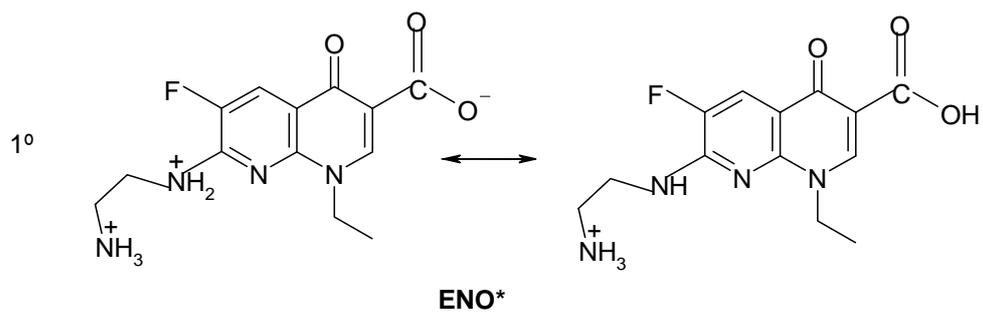
a) La presencia del oxo-anillo en el OFLO parece estabilizar la molécula frente a la fotodegradación, de tal manera que, aparentemente, no se observa la formación de fotoproductos. Alternativamente podría pensarse que los cambios estructurales no aportan características espectrales diferenciables con respecto al OFLO original.

Cromatográficamente se observa una disminución de la altura del pico de OFLO a tiempos de irradiación elevados, pero no se observa la aparición de ningún pico nuevo achacable a la formación de un fotoproducto en un tiempo de elución razonable.

b) ENO y CIPRO presentan un comportamiento muy parecido generando por irradiación mayoritariamente el correspondiente derivado de la etilendiamina.

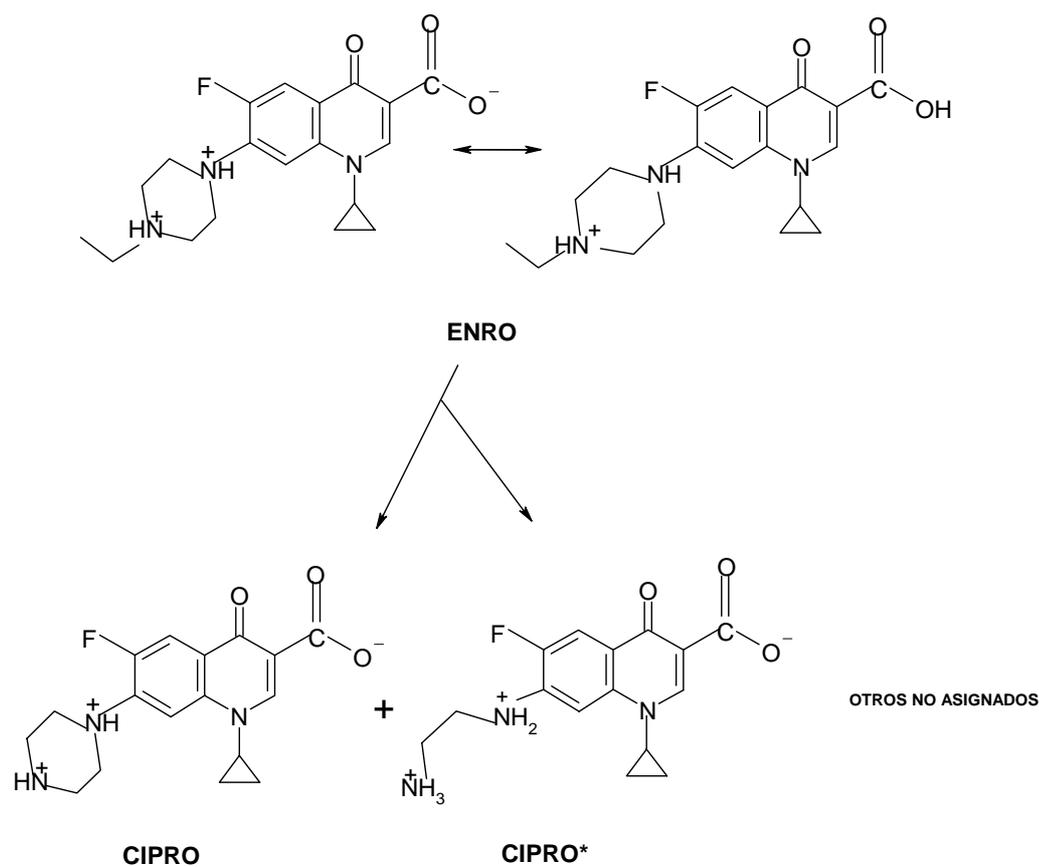
Cromatográficamente el factor discriminante en cuanto a la retención en C18 es la presencia del anillo de ciclopropil en el CIPRO*, que aumenta el tiempo de retención con respecto al ENO*.

La secuencia de elución obtenida, en las condiciones cromatográficas, de las especies predominantes de los fotoproductos a pH= 3.0 es:



Se incluye una tabla resumen 1 que contiene los valores de pK en varios medios.

c) El ENRO genera una mezcla de productos entre los que cromatográficamente se pueden distinguir CIPRO y CIPRO*, entre otros.



En la tabla resumen 2 se muestran los parámetros relacionados con la regresión lineal de las señales de fluorescencia de los fotoproductos con la concentración de las diferentes fluoroquinolonas estudiadas.

La *conclusión global* de este estudio es que podemos proponer, como metodología para la determinación cuantitativa de fluoroquinolonas de forma muy sensible, la generación de los correspondientes fotoproductos en medio hidroetanólico. Del solapamiento espectral observado, similar al obtenido en medio micelar, se deduce la posibilidad de llevar a cabo determinaciones simultáneas de forma más sensible, mediante métodos de análisis multivariante, sin separación previa. De los estudios cromatográficos previos realizados se desprende la posibilidad de llevar a cabo separaciones cromatográficas en fase reversa y detección fluorescente, bien de las fluoroquinolonas de partida y/o de las fotoproductos generados. Estos posibles avances se exploraran en capítulos posteriores.

Tabla resumen 1.

Valores de pK en medio acuoso, e hidroetanólico (50%) de las fluoroquinolonas estudiadas y de los fotoproductos generados en su caso.

Analito	pK (en agua)	pK (en etanol/agua; 50%)	Especie responsable de la señal	pK (etanol /agua)
ENO	6.04	7.01	ENO*	6.85
	9.55	10.50		-----
NOR	5.90	6.61	NOR*	4.70
	8.77	-----		7.13
OFLO	5.59	6.42	OFLO	-----
	8.95	-----		6.42
CIPRO	6.02	7.49	CIPRO*	7.15
	8.58	-----		-----
ENRO	5.29	6.84	CIPRO CIPRO*	no se calculan
	8.26	-----		

Tabla resumen 2.

Sensibilidad de calibración y límites de detección obtenidos previa irradiación de las fluoroquinolonas estudiadas en el intervalo de 0-100 ng mL⁻¹.

Fluoroquinolonas analitos	Sensibilidad de calibración*	Límite de detección**
ENO	1.37	0.86
NOR	2.91	4.33
OFLO	1.99	1.50
CIPRO	2.13	5.38
ENRO	1.47	2.67

*** UF. mL ng⁻¹: ** ng mL⁻¹ según criterio de Cayton.**

Capítulo VI.

Determinación simultánea de norfloxacin, enoxacin y ofloxacin en orina mediante fluorescencia fotoinducida.

1. Introducción

La determinación simultánea de estos tres analitos en orina, se llevó a cabo anteriormente, utilizando para ello fluorescencia molecular en un medio micelar. La resolución de la mezcla compleja de analitos fue resuelta mediante el empleo de técnicas de calibración multivariante. En este caso, se utilizó la metodología de Mínimos Cuadrados Parciales o PLS. Se comprobó que los resultados obtenidos, para todos los casos, estaban en recuperaciones próximas al 100%. Como se estudió anteriormente, fue necesario introducir en la matriz de calibración, tanto un conjunto de blancos de orina así como, en cada patrón, un fondo de orina. Se comprobó como, de este modo, se pudo modular la señal debida al fondo, y así resolver con éxito la mezcla problema.

En el capítulo cinco se comentó como se produce un incremento importante de la sensibilidad, especialmente del enoxacino, cuando los analitos son sometidos a una irradiación externa en un medio hidroalcohólico. El incremento notable de la sensibilidad observada para este analito, hace interesante la aplicación de la metodología de la fluorescencia fotoinducida, para llevar a cabo la determinación simultánea de las tres fluoroquinolonas de interés en diferentes fluidos biológicos.

Dado que en estudios anteriores¹ se ha demostrado que la utilización de señales analíticas de segundo orden, empleando la denominada ventaja de segundo orden, presenta grandes ventajas en el análisis de muestras complejas, por ejemplo de suero, en este capítulo se han registrado los correspondientes espectros de excitación-emisión fluorescente de los fotoproductos obtenidos y se han empleado como señales en los modelos multivariantes. A partir de estos espectros se extrajeron los correspondientes espectros de emisión para su análisis mediante metodología PLS y así comparar los resultados obtenidos mediante señales de primer y segundo orden. En este caso fue necesario optimizar la longitud de onda de excitación empleando una de compromiso utilizada para analizar de forma simultánea a los tres analitos.

¹ Muñoz de la Peña, A.; Espinosa Mansilla, A., González Gómez, D.; Olivieri, A., Goicoechea, H., *Analytical Chemistry* 75, 2640, 2003

La metodología PARAFAC se está incorporando dentro del análisis químico quimiométrico. En la bibliografía podemos encontrar varios trabajos basados en esta metodología para llevar a cabo determinaciones cuantitativas (calibración de segundo orden). Generalmente, la calibración de segundo orden se desarrolla empleando el algoritmo denominado como GRAM para ajustar el modelo PARAFAC²⁻⁶.

Actualmente, se ha desarrollado un gran número de nuevas metodologías para intentar ajustar el modelo PARAFAC⁷, la mayoría de ellas propuestas por los mismos autores.

En este capítulo se han introducido también cálculos correspondientes a la aplicación de la metodología SWATLD. Este algoritmo de descomposición trilineal fue propuesto por Chen y col.⁸. *Self-weighted Alternating Trilinear Decomposition* y es un algoritmo similar a ATLD (*Alternating Trilinear Decomposition*)⁹. El cálculo mediante SWATLD 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 manera que 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.

El objetivo principal en un análisis químico, es la búsqueda de procedimientos o metodologías, que permitan cuantificar a un determinado analito o conjunto de analitos en una mezcla, mediante la eliminación de las influencias que puedan ser debidas a otros compuestos presentes. Debido al gran avance de la quimiometría, se han desarrollado algoritmos que permiten soslayar estos inconvenientes. Símbolo de este avance es la metodología PARAFAC. Como se ha estudiado en capítulos anteriores, este algoritmo está

² Booksh, K.S.; Henshaw, J.M.; Burgess, L.W.; Kowalski, B.R.; *Journal Chemometrics*, 9, 263, 1995

³ Faber, N.M.; Buydens, L.M.C.; Kateman, G.; *Journal Chemometrics*, 8, 147, 1994

⁴ Faber, N.M.; Buydens, L.M.C.; Kateman, G.; *Journal Chemometrics*, 8, 181, 1994

⁵ Faber, N.M.; Buydens, L.M.C.; Kateman, G.; *Journal Chemometrics*, 8, 273, 1994

⁶ Sanchez, E.; Kowalski, B.R.; *Analytical Chemistry*, 58, 496, 1986

⁷ Faber, M.; Bro, R.; Hopke, P.K.; *Chemometrics and Intelligent laboratory System.*, 65, 119, 2003

⁸ Chen, Z.P.; Wu, H.L.; Jiang, J.H.; Li, Y.; Yu, R.Q.; *Chemometrics and intelligent laboratory systems*. 52, 75, 2000

⁹ Wu, H.L.; Shibukawa, M.; Oguma, K.; *Journal Chemometrics* 12, 1, 1998

basado en mínimos cuadrados alternos, en los que el número de fluoróforos (factores) presentes influye de forma notable en la calibración, de manera que empleando un número correcto de factores, el uso de PARAFAC nos conduce a determinar de forma exacta la concentración de un determinado analito en presencia de interferencias no modeladas, haciendo uso de la conocida ventaja de segundo orden. Uno de los principales inconvenientes que se pueden encontrar en PARAFAC, es precisamente la selección del adecuado número de factores. De manera que la aplicación de PARAFAC no es sencilla. Existen diversos métodos¹⁰⁻¹⁵ 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.

Además de esta dificultad, PARAFAC presenta el inconveniente de que la velocidad con la que se alcanza la convergencia no es elevada¹⁶, 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 costo computacional. En la bibliografía se han propuesto diferentes métodos que intentan evitar este aspecto negativo de PARAFAC. Así, Kiers y Krijnem¹⁷ abordaron el problema causado por el empleo de un elevado número de observaciones, proponiendo combinaciones de matrices loadings y conjuntos de datos, en lugar de usar las matrices de loadings por si mismas en el proceso iterativo. De este modo se reduce el tamaño de las matrices, y se produce un

¹⁰ Malinowski, E.R.; Kowalski, B.; *Chemometrics: Theory and Application*, ACS Symp. Ser. 52 American Chemical Society, Washington, DC, 1977, Cap. 3

¹¹ Malinowski, E.R.; Howery, D.G.; *Howery, Factor Analysis in Chemistry*, Wiley-Interscience, N.Y. 1980

¹² Woodruff, H.B.; Tway, P.C.; Cline Love, L.J.; *Analytical Chemistry*, 81, 53, 1981

¹³ Wold, S.; *Technometrics*, 20, 1987

¹⁴ Chen, Z.P.; Liang, Y.Z.; Jiang, J.H.; Li, Y., Qian, J.Y.; Yu, R.Q.; *Journal Chemometrics* 13, 15, 1999

¹⁵ Bro, R., Kiers, H.A.L.; 17, 274, 2003

¹⁶ Bro, R.; *Chemometrics and Intelligent Laboratory System*. 5, 143, 1992

¹⁷ Kiers, H.A.L.; Krijnem, W.P.; *Psychometrica*, 56, 147, 1991

descenso del tiempo de cálculo. Por otro lado, Alsberg y Kwalheim^{18,19} describen un conjunto de métodos para acelerar los cálculos en PARAFAC utilizando un sistema de compresión de datos similar a la aproximación CANDELIN²⁰. Andersson y Bro²¹ propusieron una poderosa herramienta para comprimir datos de enorme tamaño empleando el algoritmo Tucher²². Todas estas técnicas 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 otro lado, existen otros métodos que intentan acelerar el tiempo de cálculo, mediante la reducción del número de iteraciones. Por ejemplo, Mitchell and Burdick²³ sugieren evitar las “zonas pantanosas” debida a degeneraciones en los cálculos; es decir, existen ciertas ocasiones en las que los cálculos avanzan de forma muy lenta, de manera que los cálculos se detienen cuando el sistema entra en estas *zonas pantanosas*, comenzando una nueva iteración aleatoria. Paatero²⁴ introduce un nuevo algoritmo PMF3 (*Positive Matrix Factorization*) encaminado a reducir el número de iteraciones. El algoritmo presenta la capacidad de ponderar los datos durante el proceso iterativo. Recientemente, Kiers²⁵ ha propuesto un algoritmo en tres etapas, que reduce de forma importante el número de iteraciones.

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.

¹⁸ Alsberg, B.K.; Kwalheim, R.A.; *Chemometrics and Intelligent laboratory System.*, 24, 31, 1994

¹⁹ Alsberg, B.K.; Kwalheim, R.A.; *Chemometrics and Intelligent laboratory System.*, 24, 43, 1994

²⁰ Kiers, H.A.L.; Harshman, R.A.; *Chemometrics and Intelligent laboratory System.*, 39, 31, 1997

²¹ Bro, R.; Andersson, C.A.; *Chemometrics and Intelligent laboratory System.*, 42, 105, 1998

²² Andersson, C.A.; Bro, R.; *Chemometrics and Intelligent laboratory System.*, 42, 93, 1998

²³ Mitchell, B.C.; Burdick, D.S.; *Chemometrics and Intelligent laboratory System.* 34, 85, 1996

²⁴ Paatero, P.; *Chemometrics and Intelligent laboratory System.* 38, 223, 1997

²⁵ Kiers, H.A.L.; *Journal Chemometrics*, 12, 95, 1997

Con SWATLD se solventan estos dos inconvenientes⁸; por un lado, este algoritmo se hace más insensible a un excesivo número de factores y, por otro, reduce de forma importante el número de iteraciones.

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.

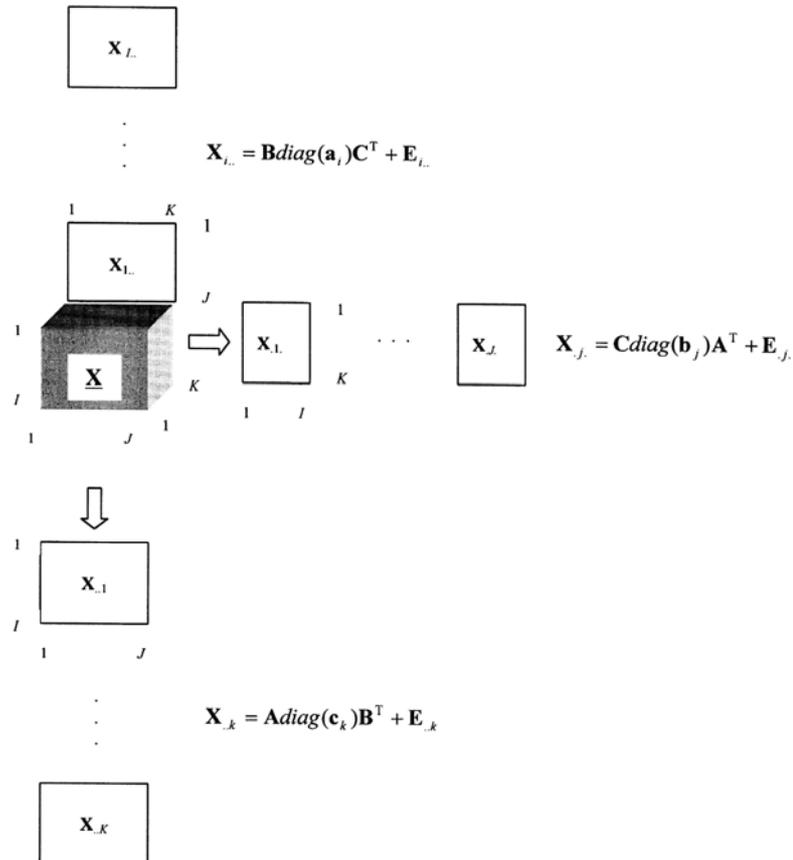
La razón que esgrimen estos autores para la utilización de estas tres funciones, radica en que están intrínsecamente relacionadas entre sí. De este modo el algoritmo es capaz de obviar “zonas pantanosas” de la optimización, que PARAFAC no es capaz de soslayar.

De manera que la descomposición propuesta en SWATLD del cubo de datos, es única en el sentido de que es capaz de evitar las zonas pantanosas, mediante la optimización alternante de las tres funciones objetivo que plantea.

La mayor velocidad en el proceso de optimización conlleva, además, una segunda ventaja, el hecho de ser insensible a un exceso de factores en el proceso de cálculo. Mientras que en PARAFAC un exceso de factores tiene una gran influencia en las predicciones, SWATLD presenta unos resultados coincidentes con los que se obtienen cuando se emplea un adecuado número de factores. En otras palabras, SWATLD no requiere determinar de forma exacta el número óptimo de factores. Tan sólo el empleo de un número de ellos extremadamente elevado, puede conducir a resultados no reales.

SWATLD: Modelo y algoritmo

Nomenclatura: I, J, K se utilizarán para indicar las dimensiones en las matrices de datos; F será el número actual de factores y N el número de factores utilizados en los cálculos. Con $\underline{\mathbf{X}}$ representamos la matriz tridimensional de datos. Las matrices loading serán \mathbf{A}, \mathbf{B} y \mathbf{C} , que, para un caso concreto de EEM's, \mathbf{A} y \mathbf{B} serán matrices espectrales y \mathbf{C} será una matriz de concentraciones relativas. Finalmente, la matriz de los errores se denotará con la letra $\underline{\mathbf{E}}$.



En calibración lineal de segundo orden, está ampliamente aceptado el modelo propuesto por Harshman²⁶ y Carrol-Chang²⁷, debido a su consistencia con la ley de Beer. Este modelo puede escribirse como:

$$X = AB^T + E \quad \text{Ecuación 1}$$

Harshman y Caroll-Chan proponen un sistema de mínimos cuadrados alternantes para resolver la ecuación anterior, asumiendo de forma sucesiva que dos de los modos de las matrices loadings son conocidos y estimando los parámetros no conocidos para el tercer modo, de manera que estos parámetros hagan mínima la siguiente función:

$$S(A, B, c_1, \dots, c_k) = \sum_{k=1}^K \|X_{..k} - A \text{diag}(c_k) B^T\|_F^2 \quad \text{Ecuación 2}$$

donde $\| \cdot \|$ representa la matriz normalizada de Frobenius.

PARAFAC presenta un amplio número de ventajas estadísticamente hablando, tales como la determinación de los resultados finales en términos de mínimos cuadrados. Sin embargo, presenta los inconvenientes de baja velocidad de cálculo y el requerimiento de la determinación precisa del número de factores en la mezcla. La matrices loadings estimadas **A**, **B** y **C** son correctas únicamente cuando se ha estimado correctamente el número de factores^{26,28,29}.

²⁶ Harshman, R.A.; *UCLA Working Papers in Phoenetics* 16, 1, 1970

²⁷ Carrol, J.D.; Chang, J.; *Psychometrika*, 35, 283, 1970

²⁸ Kruskal, J.B.; *Linear Algebra Appl.* 18, 95, 1977

²⁹ Kruskal, J.B.; *Psychometrika*, 41, 281, 1976

Como se ha mencionado anteriormente, la baja velocidad de convergencia es debida principalmente al alto grado de multicolinealidad en los datos, lo que hace que la superficie de respuesta de la función que minimiza el error de regresión varíe de forma mínima, aunque los parámetros estimados lo hagan de forma importante.

Chen y col.⁸, con el propósito de establecer un algoritmo con una mayor velocidad de convergencia, consideran la posibilidad de resolver el modelo trilinear resolviendo de forma alternada las tres siguientes funciones objetivos, a diferencia de lo que hace PARAFAC.

$$S(\mathbf{C}) = \sum_{k=1}^K \left(\left\| \frac{(\mathbf{A}^+ \mathbf{X}_{..k} - \text{diag}(\mathbf{c}_k) \mathbf{B}^T)^T}{\text{diag}(\text{sqrt}(1./\text{diagm}(\mathbf{B}^T \mathbf{B})))} \right\|_{F^2} + \left\| \frac{(\mathbf{X}_{..k} (\mathbf{B}^+)^T - \mathbf{A} \text{diag}(\mathbf{c}_k))}{\text{diag}(\text{sqrt}(1./\text{diagm}(\mathbf{A}^T \mathbf{A})))} \right\|_{F^2} \right) \text{Ecuación 3}$$

Con **A** y **B** fijas, se minimiza $S(\mathbf{C})$ para obtener **C**

$$S(\mathbf{B}) = \sum_{j=1}^J \left(\left\| \frac{(\mathbf{C}^+ \mathbf{X}_{.j} - \text{diag}(\mathbf{b}_j) \mathbf{A}^T)^T}{\text{diag}(\text{sqrt}(1./\text{diagm}(\mathbf{A}^T \mathbf{A})))} \right\|_{F^2} + \left\| \frac{(\mathbf{X}_{.j} (\mathbf{A}^T)^+ - \mathbf{C} \text{diag}(\mathbf{b}_j))}{\text{diag}(\text{sqrt}(1./\text{diagm}(\mathbf{C}^T \mathbf{C})))} \right\|_{F^2} \right) \text{Ecuación 4}$$

Con **A** y **C** fijas, se minimiza $S(\mathbf{B})$ para obtener **B**

$$S(\mathbf{A}) = \sum_{i=1}^I \left(\left\| \left(\mathbf{B}^+ \mathbf{X}_{i..} - \text{diag}(\mathbf{a}_i) \mathbf{C}^T \right)^T \times \left\| \text{diag}(\text{sqrt}(1./\text{diagm}(\mathbf{C}^T \mathbf{C}))) \right\| \right\|_{\mathbf{F}^2} + \left\| \left(\mathbf{X}_{i..} (\mathbf{C}^T)^+ - \mathbf{B} \text{diag}(\mathbf{a}_i) \right) \times \left\| \text{diag}(\text{sqrt}(1./\text{diagm}(\mathbf{B}^T \mathbf{B}))) \right\| \right\|_{\mathbf{F}^2} \right) \quad \text{Ecuación 5}$$

Con \mathbf{B} y \mathbf{C} fijas, se minimiza $S(\mathbf{A})$ para obtener \mathbf{A}

Donde $\mathbf{1}$ es el vector identidad de tamaño apropiado, el operador $./$ indica división vectorial y $\text{sqrt}(\cdot)$ operador raíz cuadrada. Finalmente, las matrices diagonales empíricas, $\text{diag}(\text{sqrt}(1./\text{diagm}(\mathbf{A}^T \mathbf{A})))$ y $\text{diag}(\text{sqrt}(1./\text{diagm}(\mathbf{B}^T \mathbf{B})))$, y $\text{diag}(\text{sqrt}(1./\text{diagm}(\mathbf{C}^T \mathbf{C})))$, son matrices sopesadas para balancear las dos partes de cada una de las tres funciones objetivo.

Chen y col.⁸ justifican este sistema de minimización alternada de las tres funciones objetivos, teniendo en cuenta que las relaciones intrínsecas existentes entre ellas y sus soluciones, son iguales a las de las matrices loading libres de error del modelo trilineal. En presencia de ruido, las funciones objetivos tienen diferentes superficies de respuesta. De este modo, se puede esperar que en el proceso de minimización alternante de las tres funciones objetivos, se pueden obviar las zonas pantanosas, lo cual era difícil en la metodología PARAFAC, ya que tan solo minimizaba una única función global.

En base a todo lo anterior, Chen y col. desarrollaron el algoritmo denominado *self-weighted alternating trilinear decomposition* (SWATLD), que se esquematiza a continuación:

1. Iniciación aleatoria de las matrices loading **A** y **B**.
- 2.

$$c_k = \frac{1}{2} \begin{pmatrix} \text{diagm}(\mathbf{B}^+ \mathbf{X}_{..k}^T \mathbf{A}) / \text{diagm}(\mathbf{A}^T \mathbf{A})_+ \\ \text{diagm}(\mathbf{A}^+ \mathbf{X}_{..k} \mathbf{B}) / \text{diag}(\mathbf{B}^T \mathbf{B}) \end{pmatrix}$$

$k = 1, \dots, K$

- 3.

$$b_j = \frac{1}{2} \begin{pmatrix} \text{diagm}(\mathbf{A}^+ \mathbf{X}_{.j}^T \mathbf{C}) / \text{diagm}(\mathbf{C}^T \mathbf{C})_+ \\ \text{diagm}(\mathbf{C}^+ \mathbf{X}_{.j} \mathbf{A}) / \text{diagm}(\mathbf{C}^T \mathbf{C}) \end{pmatrix}$$

$j = 1, \dots, J$

- 4.

$$a_i = \frac{1}{2} \begin{pmatrix} \text{diagm}(\mathbf{C}^+ \mathbf{X}_{i..}^T \mathbf{B}) / \text{diagm}(\mathbf{B}^T \mathbf{B})_+ \\ \text{diagm}(\mathbf{B}^+ \mathbf{X}_{i..} \mathbf{C}) / \text{diagm}(\mathbf{C}^T \mathbf{C}) \end{pmatrix}$$

$i = 1, \dots, I$

5. Actualización las matrices **C**, **B** y **A** de acuerdo a las etapas 2-4. Este paso se repite hasta que se alcanza la convergencia de acuerdo al criterio que se establezca

En el trabajo en el que proponen este método, Chen y col.⁸ demuestran que SWATLD presenta una mayor velocidad de convergencia. Así mismo, que la utilización de un número de factores superior al número de factores óptimos conduce a soluciones reales, y no a combinaciones lineales de las mismas; es decir, que SWATLD no requiere una estimación precisa del número óptimo de factores. Este hecho es esencial para análisis en los que resulta complejo determinar el número óptimo de factores, ya que se puede utilizar un número de factores por exceso.

2. Experimental.

Diseño de la matriz de calibración

Se ha utilizado un método de diseño denominado *diseño central compuesto*. Este diseño es un paso fundamental para posteriormente obtener una matriz de calibrado con una buena capacidad de resolución. Es importante evitar colinealidades, así como emplear un número suficientemente bajo de patrones y, a la vez, abarcar un amplio rango de concentraciones, que incluyan las relaciones que pueden existir entre las concentraciones de los componentes en las muestras de interés.

Para un diseño central compuesto con tres analitos, es necesario utilizar un total de 15 patrones. Gráficamente podemos ver este diseño en el espacio como un cubo, en el que en cada uno de los vértices del cubo tenemos un patrón ($2^3=8$), en cada una de las caras del cubo, proyectadas hacia el exterior, tenemos otro patrón ($1 \times 6=6$) y finalmente un patrón en el centro del cubo; lo que da lugar a un total de 15 patrones. En la figura siguiente podemos ver de forma gráfica este diseño.

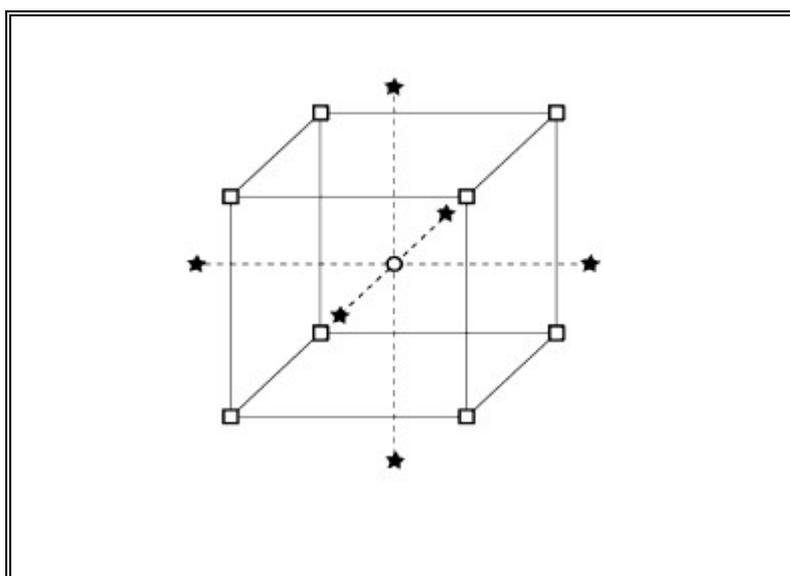


Figura VI. 1.- Diseño central compuesto para 3 factores.

El rango de concentraciones de cada uno de los analitos, se optimizó de forma que el patrón más concentrado no saturase el detector, en las condiciones instrumentales fijadas. De este modo, las concentraciones de enoxacino y ofloxacino, estarían dentro del intervalo de 0-160 ng/mL y las de norfloxacino entre 0-80 ng/mL.

Las condiciones experimentales de trabajo se establecieron de acuerdo a los estudios realizados en el capítulo anterior. De este modo, se trabaja en un medio hidroalcohólico, empleando un medio al 50 % etanol/agua. El pH óptimo de irradiación se fijó alrededor de 6.8. Esta acidez se establece mediante el empleo de disolución reguladora tris (hidroximetil) aminometano /HCl, de pH 7.05. Una vez obtenido el fotoproducto, la forma más fluorescente de este se consigue al fijar un pH de 4.0, para lo cual se añaden 20.0 μ L de disolución HCl 0.1 M.

En la Tabla VI. 1 se indican las concentraciones de los patrones correspondientes al set de calibración.

Tabla VI. 1. Composición del set de calibrado.

Enoxacino ($\mu\text{g/mL}$)	Norfloxacin ($\mu\text{g/mL}$)	Ofloxacin ($\mu\text{g/mL}$)
33.8	16.9	33.8
33.8	16.9	126
33.8	63.1	33.8
33.8	63.1	126
126	16.9	33.8
126	16.9	126
126	63.1	33.8
126	63.1	126
0	40	80
160	40	80
80	0	80
80	80	80
80	40	0
80	40	160
80	40	80

Se registraron los correspondientes espectros de excitación-emisión fluorescente, de manera que el barrido de excitación se realizó de 210 nm hasta 360 nm, con un incremento de 3 nm y la emisión se realizó de 360 a 597 nm, con un incremento de 3 nm. De acuerdo con esto, cada matriz de datos consta de 51 espectros de excitación, y cada espectro de emisión constaría de 80 puntos o datos experimentales. El número total de puntos, para cada patrón, es de 4080. Como se ha indicado anteriormente, a partir de los espectros tridimensionales, se obtuvieron los correspondientes espectros de emisión, para de este modo hacer los posteriores estudios de PLS. Así, utilizaremos los mismos espectros tanto en los análisis empleando metodologías de primer como de segundo orden.

Figura VI.2 se muestra como a partir de un espectro tridimensional obtenemos el correspondiente espectro de emisión, a una longitud de onda de excitación de 276 nm.

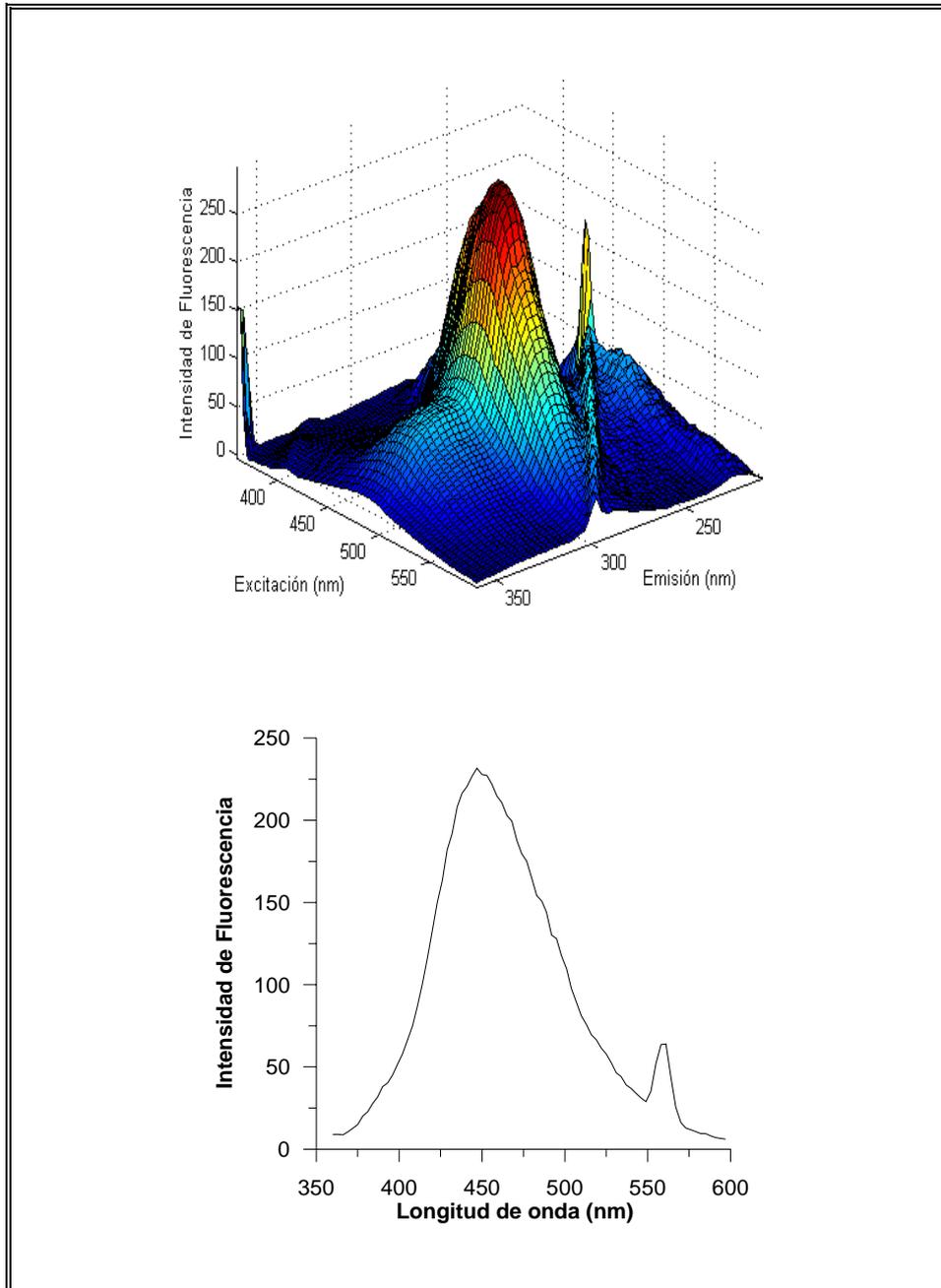


Figura VI.2.- Espectro tridimensional y bidimensional del primer patrón de calibrado.

Podemos constatar que 276 nm es la longitud de onda de excitación apropiada de acuerdo con la Figura VI.3.

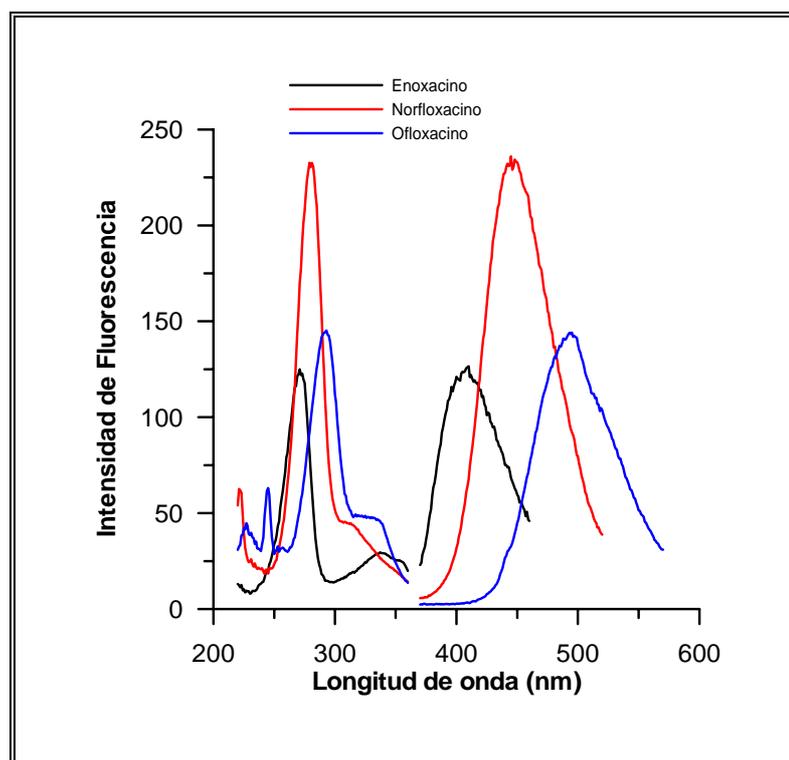


Figura VI. 3.- Espectros de excitación y emisión para ENO (λ_{em} 406 nm λ_{exc} 260 nm), NOR (λ_{em} 444 nm λ_{exc} 277 nm) y OFLO (λ_{em} 490 nm λ_{exc} 280 nm)

Calibración multivariante empleando PLS-1

En primer lugar se abordó el estudio de la resolución de las mezclas de estos analitos mediante PLS-1.

Los cálculos se han realizado mediante una serie de programas no comerciales^{30,31} desarrollados bajo el entorno MATLAB 5.3³².

Para la determinación del número óptimo de factores se realizó el cálculo del PRESS mediante validación cruzada y se siguió el criterio propuesto por Haaland y Thomas³³ para su elección, los resultados son los que se recogen en la Tabla VI. 2.

Tabla VI. 2.- Parámetros de la calibración mediante PLS-1

Componente	Nº. Factores	PRESS	REP %	R ²
Enoxacino	3	1.67x10 ²	4.2	0.994
Norfloxacino	3	1.35x10 ²	7.4	0.983
Ofloxacino	3	1.30x10 ²	3.7	0.996

³⁰ Goicoechea, H.C.; Iñón, F.A.; Olivieri, A.C.; *Chemometrics and Intelligent laboratory System.* 73, 189, 2004

³¹ Alejandro Olivieri. Universidad Nacional de Rosario. Argentina. 2003

³² MATLAB 5.3. The Mathworks, Inc.

³³ Haaland, D; Thomas, E.; *Anal.Chem.* 60, 1193, 1988

Calibración multivariante empleando N-PLS y unfolded-PLS.

Se ha realizado la correspondiente calibración empleando tanto N-PLS como unfolded-PLS, empleando como señales de segundo orden los correspondientes espectros tridimensionales de excitación-emisión fluorescentes.

Los cálculos se llevaron a cabo con programas informáticos no comerciales^{30,31} programados bajo el entorno MATLAB 5.3³². Las rutinas desarrolladas por Bro para aplicar N-PLS están disponibles en Internet³⁴. Se utilizó una interface gráfica similar a la utilizada para métodos que usan datos de primer orden, cedida por sus autores³⁰.

Nuevamente para la determinación del número óptimo de factores se empleó el criterio de Haaland y Thomas. Los parámetros de la calibración aparecen en la Tabla VI.3.

Tabla VI. 3.- Parámetros de la calibración con N-PLS y con unfolded-PLS

Componente	Nº factores ^a	PRESS	REP (%)	R ²
Enoxacino	3/3	1.466x10 ² / 1.447 x10 ²	2.9/2.8	0.9998/0.9998
Norfloxacino	3/3	1.282x10 ² / 1.324 x10 ²	5.5/5.5	0.9993/0.9993
Ofloxacino	3/3	3.837 x10 ² / 3.772x10 ²	4.8/4.7	0.9995/0.9995

^a NPLS/UPLS

³⁴ <http://www.models.s.kvl.dk/source/>

Calibración multivariante empleando PARAFAC y SWATLD

Para su aplicación se utilizó la interface gráfica ya mencionada³¹. El empleo de la metodología PARAFAC 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. De este modo, el set de calibrado no sólo está formado por un conjunto de patrones, en nuestro caso y de acuerdo al diseño experimental empleado 15 patrones, sino que, además, se suma cada una de las muestras problemas; de este modo tendremos un total de 16 espectros para aplicar esta metodología.

La inclusión de la muestra problema en el calibrado es una de las ventajas que presentan este tipo de calibrados ya que, de este modo, podremos tener en cuenta la presencia de los interferentes que supone la matriz en la que se encuentra el analito de interés en la etapa de calibración, lo cual mejora las predicciones.

La determinación del número óptimo de factores se realiza en función del método denominado *Core Consistency Diagnostic*³⁵ (Corcondia). Consiste en examinar el modelo basado en los datos y los parámetros estimados de modelos aumentados gradualmente. Se dice que el modelo es apropiado si la adición de otras combinaciones de los mismos componentes no mejora considerablemente el ajuste. Cuando el valor del Core Consistency (Consistencia de núcleo) baja desde un valor alto, por encima aproximadamente del 60 %, a un valor bajo, esto indica que se ha llegado al número apropiado de componentes.

³⁵ Bro,R; Kiers, H.A.L.; *Journal of Chemometrics*,17, 274, 2003

Es de esperar, en nuestro caso, en el que tenemos un total de tres componentes, en muestras preparadas en ausencia de interferentes, que el número óptimo de factores sea igual o superior a tres. Sin embargo, la determinación del número óptimo de factores, empleando el criterio anteriormente descrito, no resultó totalmente evidente. Para todas las muestras analizadas, el número de factores óptimo fue superior a tres, encontrándose que, dependiendo de la muestra analizada, el número correcto variaba entre 5 y 6 factores. Las diferencias en las predicciones fueron mínimas, tan solo varió de forma considerable el tiempo de cálculo. Se eligió un número de factores óptimos igual a 5.

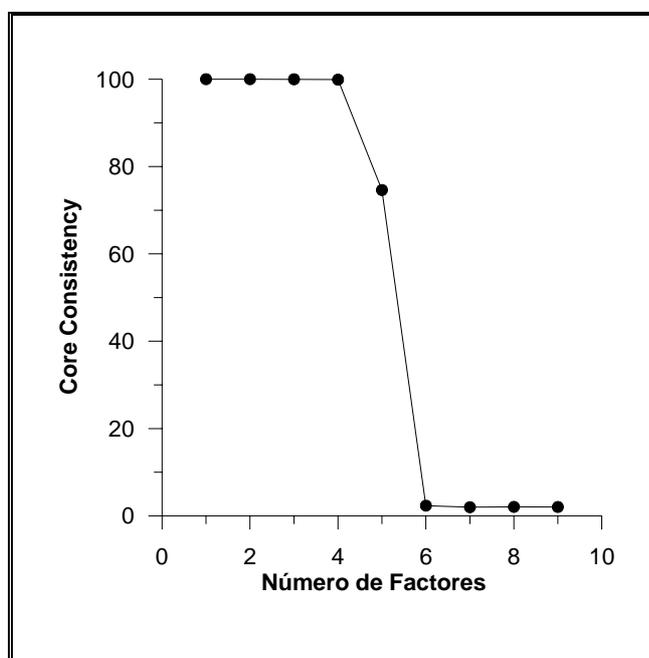


Figura VI. 4. Representación del core consistency en función del número de factores para una muestra de ENO, NOR y OFLO.

En el caso de SWATLD, al ser más insensible al exceso de factores, se estableció como óptimo un total de 6 factores. Se pudo observar como, a diferencia de PARAFAC, la velocidad de cálculo en esta metodología es bastante superior.

Validación de los métodos.

Para la validación de los métodos quimiométricos empleados, se prepararon un conjunto de muestras de predicción, en las que la concentración de los analitos de interés variaba dentro de los intervalos de concentraciones establecidos en la matriz de calibración. En estas muestras, que constituyen el conjunto de validación, no se añade ningún tipo de interferente, y se preparan de forma tal que estén en las condiciones menos favorables, es decir, que sus concentraciones estén tanto en los extremos de más bajas como de más altas concentraciones. Se prepararon mezclas tanto ternarias como binarias. Los resultados son los que aparecen en las siguientes tablas VI.4 y VI.5.

Tabla VI. 4.- Composición de las mezclas binarias.

Enoxacino (ng/mL)	Norfloxacino (ng/mL)	Ofloxacino (ng/mL)	Muestra
20	70	0	B1
150	20	0	B2
0	70	20	B3
0	20	150	B4
150	0	20	B5
20	0	150	B6

Tabla VI. 5.- Composición de las mezclas ternarias.

Enoxacino (ng/mL)	Norfloxacino (ng/mL)	Ofloxacino (ng/mL)	Muestra
20	70	150	T1
26	20	150	T2
150	70	20	T3
150	20	150	T4
150	70	150	T5
20	20	20	T6

Las predicciones de estas muestras de validación aparecen en las tablas VI. 6, 7 y 8

Tabla VI. 6.- Predicciones para enoxacino por diferentes metodologías multivariantes

Muestra	PLS		N-PLS		unfolded-PLS		PARAFAC		SWATLD	
	Cpre.	R(%)	Cpre.	R(%)	Cpre.	R(%)	Cpre.	R(%)	Cpre	R(%)
B1	22	110	18.2	91	18.5	92.5	20.1	100	20	100
B2	144	96	134	89	137	91	132	89	133	89
B3	2.17	--	0	--	0	--	--	--	--	--
B4	4.19	--	3.78	--	4.2	--	--	--	--	--
B5	151.1	100	144	96	143.2	95	137	91	137	91
B6	22.36	112	21.5	107	22.5	112	19.0	95	20	100
T1	21.74	108	20.6	103	18.7	93.5	22.0	110	25	125
T2	24.88	95.6	23.5	117	23.3	116	21.7	108	21	105
T3	144.9	96.6	146	97	146	97	149.4	100	149	99
T4	145.1	97	144	96	144	96	143	95	143	95
T5	142	95	141	94	141	94	162.5	108	146	97
T6	22.6	113	22.1	110	22	110	19.1	95	20	100
REP	7.7		9.3		9.7		7.3		5.4	

Tabla VI. 7.- Predicciones para norfloxacin por diferentes metodologías multivariantes

Muestra	PLS		N-PLS		unfolded-PLS		PARAFAC		SWATLD	
	Cpre.	R(%)	Cpre.	R(%)	Cpre.	R(%)	Cpre.	R(%)	Cpre.	R(%)
B1	61	87	60	86	61	87	61.3	88	71	101
B2	17.3	86	18.1	90	18.3	91	17.9	89	20	100
B3	66.6	95	66.5	95	66.4	95	66.6	95	66	95
B4	21.6	108	22.3	111	22	110	20	100	20	100
B5	1.6	--	2.9	--	3.2	--	--	--	--	--
B6	4.2	--	4.7	--	4.8	--	--	--	--	--
T1	63.3	90	64	91	64	91	149.8	100	65	92
T2	20.4	102	21	105	21.2	106	150	100	18	92
T3	65.7	94	65.3	93	65.3	109	70	100	67	96
T4	19.8	99	20	100	20.6	103	21	105	20,3	101
T5	68.7	98	69.5	99	69.6	99	72.2	103	72	102
T6	20.4	102	21.3	106	21.4	107	20.1	100	20	100
REP	11.1		11.6		11.8		9.4		8.7	

Tabla VI. 8.- Predicciones para ofloxacino por diferentes metodologías multivariantes

Muestra	PLS		N-PLS		unfolded-PLS		PARAFAC		SWATLD	
	Cpre.	R(%)	Cpre.	R(%)	Cpre.	R(%)	Cpre.	R(%)	Cpre.	R(%)
B1	0	--	0	--	0	--	--	--	--	--
B2	0	--	0	--	0	--	--	--	--	--
B3	18.6	93	17.7	88	17.5	87.5	18.44	92	18,2	91
B4	146	97	149	99	149	99	148	99	145,9	97
B5	19	95	20.2	101	20.1	101	17.6	88	17,8	89
B6	149	99	153	102	153	102	151	101	139,5	93
T1	144	96	147	98	148	99	150	100	149,4	99
T2	147	98	151	100	151	100	150	100	148	99
T3	18.5	93	19.3	96.5	19.3	96.5	21	105	20,7	103
T4	157	105	163	109	163	109	162	108	162,7	108
T5	162	108	163	109	163	109	162	108	164,5	109
T6	22.3	111	21.9	109.5	21.9	109.5	19.5	98	20	100
REP	6.8		7.1		7.1		6.2		7.3	

En todos los casos, la utilización de señales de segundo orden proporciona una ligera mejora en los resultados del REP. En el caso del ENO y NOR los mejores REP se obtienen con SWATLD, mientras que para OFLO se obtienen con PARAFAC. En cualquier caso, los resultados son muy similares con todos los métodos, no pudiéndose establecer un comportamiento diferencial apreciable, en estas muestras artificiales que no contienen orina.

En la siguiente tabla podemos observar un resumen de los parámetros estadísticos para el grupo de predicción.

Tabla VI.9.- Parámetros estadísticos de la aplicación de PLS, unfolded-PLS, N-PLS, PARAFAC y SWATLD al análisis del test de validación

Compuesto Método	ENO		NOR		OFLO	
	REP (%)	R (%)	REP (%)	R (%)	REP (%)	R (%)
PLS-1	7.7	102 ± 7	11.1	96 ± 7	6.8	99 ± 6
N-PLS	9.3	100 ± 9	11.6	98 ± 8	7.1	100 ± 7
Unfolded-PLS	9.7	100 ± 9	11.8	100 ± 8	7.1	101 ± 4
PARAFAC	7.3	99 ± 7	9.4	98 ± 6	6.2	100 ± 6
SWATLD	5.4	98 ± 9	8.7	100 ± 4	7.3	99 ± 7

3. Determinación simultánea de norfloxacin, enoxacino y ofloxacin en muestras de orina

Muestras de orina

En primer lugar, se estudió que dilución máxima podemos aplicar a las muestras de orina fortificadas con los analitos, para que, aún quedando en los límites biológicos, las concentraciones estuviesen dentro de los intervalos de la matriz de calibrado.

Para ello, se prepara una disolución de orina, en la que se disuelven los analitos de interés en la cantidad adecuada. A partir de esta disolución, se preparan por dilución diferentes muestras, siempre manteniendo los criterios establecidos anteriormente. La dilución que se aplica se hace en dos etapas, en la primera tomamos 0.25 mL de la disolución inicial de orina llevándola a 25 mL. A partir de esta segunda disolución, se toman volúmenes comprendidos entre 0.1 a 0.7 mL, llevándolos a un volumen final de 10 mL. Una vez realizada esta última dilución, se fijan las condiciones experimentales optimizadas anteriormente.

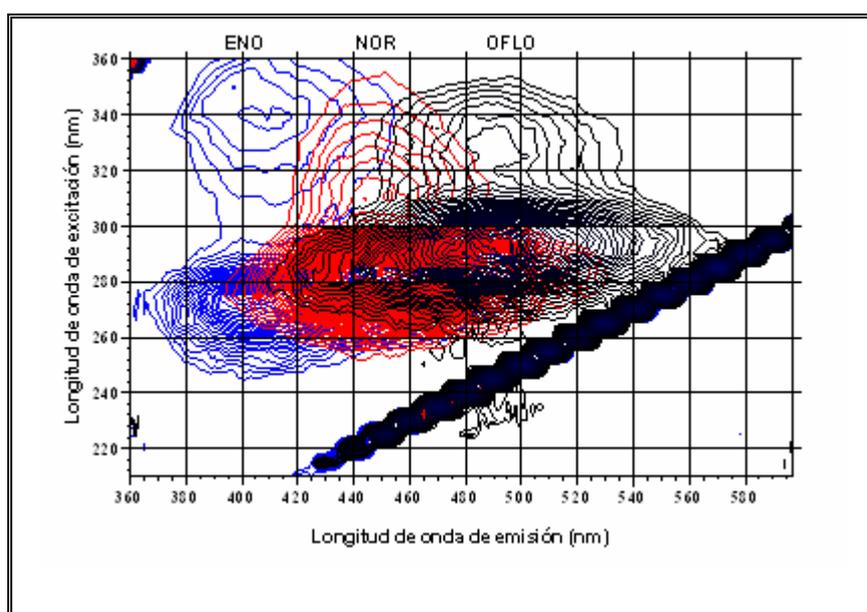


Figura VI. 5. Mapa de contorno para ENO, NOR y OFLO después de irradiación.

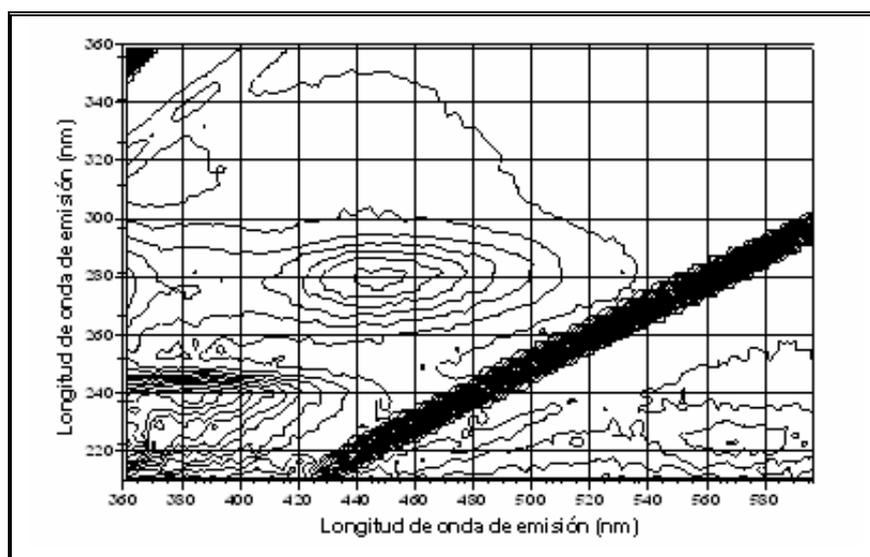


Figura VI. 6.- Mapa de contorno de una muestra de orina irradiada

En la siguiente tabla, (Tabla VI.10), se muestran los resultados calculados mediante PARAFAC en función de la dilución, para un número de factores optimizado.

Hay que señalar que tanto las matrices de calibración como los problemas y las muestras de validación se registraron en días diferentes, con un intervalo de más de 30 días. En cuanto a las muestras de orina empleadas, fueron de individuos sanos de diferentes de edades comprendidas entre 25-30 años.

Tabla VI. 10.- Determinación de la dilución adecuada mediante PARAFAC

Dilución	Enoxacino			Norfloxacino			Ofloxacino		
	Ct	Cp	% R	Ct	Cp	% R	Ct	Cp	% R
0.7/10	70	73	104	70	94	134	90	103	114
0.6/10	70	71	101	60	82	137	90	102	113
0.5/10	70	69	98	50	70	140	90	104	115
0.4/10	70	64	91	70	68	97	90	70	117
0.3/10	70	67	96	70	62	88	90	97	108
0.2/10	70	70	100	50	65	130	90	98	109
0.1/10	50	55	110	50	54	108	50	54	108

Los mayores errores se obtienen para NOR siendo necesaria un dilución 1/100 para obtener valores de recuperación adecuados.

Resultados del análisis

De acuerdo con los resultados, la dilución más apropiada correspondería al último caso. Con esta dilución se preparan muestras de orina enriquecidas con los tres analitos de manera que simulan las concentraciones que podemos encontrar en muestras de orina obtenidas de individuos bajo tratamiento (calibración A).

Tabla VI. 11.- Resultados obtenidos al aplicar PLS-1 a muestras de orina enriquecidas (calibración A)

Eno _t	Eno _c	% R	Nor _t	Nor _c	% R	Oflo	Oflo p	% R
50	63.3 (1.96)	126	50	55.17 (3.58)	110	50	58.6 (5.29)	117
90	94.08 (6.42)	104	60	65.2 (17.0)	108	110	122 (5.14)	111
110	128.4 (18.65)	116	50	60.68 (1.24)	121	90	103.0 (0.96)	114
30	37.9 (2.13)	126	30	38.6 (1.77)	129	30	35.4 (1.92)	118
80	90.6 (6.66)	113	70	84 (0.47)	119	50	58.7 (0.97)	117
110	115.8 (11.52)	105	40	49.77 (3.23)	124	70	78.8 (4.34)	112
50	47.8 (3.41)	96	80	87.15 (11.18)	112	110	122.2 (4.76)	111
70	80.50 (6.18)	115	50	60.13 (3.68)	120	90	99.6 (2.08)	111
110	103 (7.12)	94	70	86.53 (3.16)	123	150	144.27 (79.4)	96
70	74.89 (1.76)	107	50	60.65 (3.20)	121	90	103.3 (2.96)	115
REP	24.6		25.4			13.4		

Tabla VI. 12.- Resultados obtenidos al aplicar N-PLS a muestras de orina enriquecidas (calibración A).

Eno _t	Eno _c	% R	Nor _t	Nor _c	% R	Oflo _t	Oflo _c	% R
50	61.53 (3.36)	123	50	56.32 (3.91)	113	50	56.6 (2.42)	113
90	93.79 (7.31)	104	60	65.7 (16.52)	109.5	110	121 (5.72)	110
110	127,6 (19.4)	115	50	61.49 (1.04)	123	90	103.8 (2.05)	115
30	37.87 (2.89)	126	30	38.91 (1.57)	129	30	34.95 (1.37)	116
80	82.22 (6.05)	103	70	85.25 (0.94)	122	50	56.7 (2.77)	113
110	116 (10.8)	106	40	51.85 (2.19)	129.6	70	78.93 (3.89)	113
50	45.42 (3.90)	91	80	88.33 (10.31)	110	110	116 (5.90)	105
70	82.41 (7.85)	118	50	61 (3.79)	122	90	99,2 (2.07)	110
110	100.9 (7.10)	92	70	87.2 (3.31)	124	150	157,26	105
70	70.2 (4.69)	100	50	61.39 (2.33)	123	90	103.0 (5.88)	114
REP	12.3		22.0			12.5		

Tabla VI.13.- Resultados obtenidos al aplicar unfolded-PLS a muestras de orina enriquecida (calibración A).

Eno _t	Eno _c	% R	Nor _t	Nor _c	% R	Oflo _t	Oflo _c	% R
50	59.47 (0.75)	119	50	56.39 (3.87)	113	50	56.4 (2.65)	113
90	93.7 (7.06)	104	60	65.1 (15.95)	108	110	121 (5.78)	110
110	123.7 (11.85)	112	50	61.64* (1.08)	123	90	103.34 (1.86)	115
30	36.9 (2.38)	123	30	38.9 (1.56)	129.8	30	34.83 (1.31)	116
80	81.94 (4.90)	102	70	85.38 (0.98)	122	50	56 (3.70)	112
110	116 (10.8)	106	40	50.3 (3.34)	126	70	78.59 (3.84)	112
50	46 (4.09)	92	80	88.2 (10.4)	110	110	115 (5.49)	104
70	82.5 (7.92)	118	50	60.89 (3.83)	122	90	98.9 (2.07)	110
110	101.4 (7.0)	92	70	87.34 (3.3)	125	150	156,63	
70	70.54 (4.63)	101	50	61.45 (2.49)	123	90	102.7 (6.01)	114
REP	12.3		23.0			12.1		

Tabla VI. 14.- Resultados obtenidos al aplicar PARAFAC a muestras de orina enriquecidas (calibración A).

Eno _t	Eno _c	% R	Nor _t	Nor _c	% R	Oflo _t	Oflo _c	% R
50	61.3 (0.47)	122.5	50	52.8 (3.74)	105	50	56.8 (2.91)	114
90	94.9 (9.52)	105	60	66 (17.3)	110	110	122.7 (7.56)	111
110	122.6 (20.3)	111	50	77.45 (22.7)	155	90	105.8 (3.23)	117
30	35.3 (1.26)	113	30	39.0 (1.66)	130	30	33.67 (1.66)	112
80	79.72 (5.53)	100	70	88.8 (3.72)	135	50	58.46 (5.00)	117
110	116 (16.54)	105	40	50.43 (2.14)	126	70	79.41 (3.99)	113
50	53.2 (5.66)	106	80	88.0 (10.33)	110	110	117.8 (6.43)	107
70	85.8 (8.21)	123	50	61.0 (4.01)	122	90	100.3 (1.98)	111
110	107.1 (5.73)	97.4	70	87.91 (3.14)	125	150	147.1 (79.8)	98
70	72.34 (8.01)	103	50	60.74 (3.43)	121	90	103.8 (7.05)	115
REP	31.9		27.7			14.1		

Tabla VI. 15.-Resultados obtenidos al aplicar SWATLD a muestras de orina enriquecidas (calibración A).

Eno _t	Eno _c	% R	Nor _t	Nor _c	% R	Oflo _t	Oflo _c	% R
50	59,0 (2.1)	118	50	51,4 (3.4)	103	50	54,4 (0.1)	109
90	97,3 (9.8)	108	60	65,9 (6.8)	110	110	121,2 (6.2)	110
110	126,1 (6.0)	115	50	73,5 (7.4)	147	90	105,5 (3.5)	117
30	32,0 (2.7)	107	30	34,0 (4.1)	114	30	32,2 (1.2)	107
80	90,6 (4.8)	113	70	87,0 (1.0)	124	50	58,4 (4.4)	117
110	117,0 (10.5)	106	40	50,8 (3.4)	127	70	80,0 (4.5)	114
50	57,1 (6.9)	114	80	89,2 (8.8)	112	110	117,8 (6.5)	107
70	71,1 (7.0)	102	50	57,2 (0.8)	114	90	98,6 (3.4)	110
110	110,5 (6.5)	100	70	88,5 (4.5)	126	150	160,0 (2.3)	107
70	92,0 (2.8)	131	50	63,0 (1.4)	126	90	99,5 (2.1)	111
REP	13.6		23.4			11.2		

En las tablas anteriores podemos observar como los resultados no son satisfactorios, sobre todo en los analitos que están menos solapados entre sí, es decir enoxacino y ofloxacino, siendo para el norfloxacino donde se obtienen peores resultados. Con respecto a PLS frente a N-PLS y unfolded-PLS, observamos como se obtienen mejores resultados para los dos últimos casos, es decir, cuando utilizamos la mayor información espectral. Respecto a n-PLS y unfolded-PLS, los resultados son similares. Pero, en cualquier caso, los resultados que obtenemos para el norfloxacino no son nada satisfactorios. En la Figura VI. 7 podemos observar un diagrama comparativo de los valores de REP obtenidos con los distintos métodos.

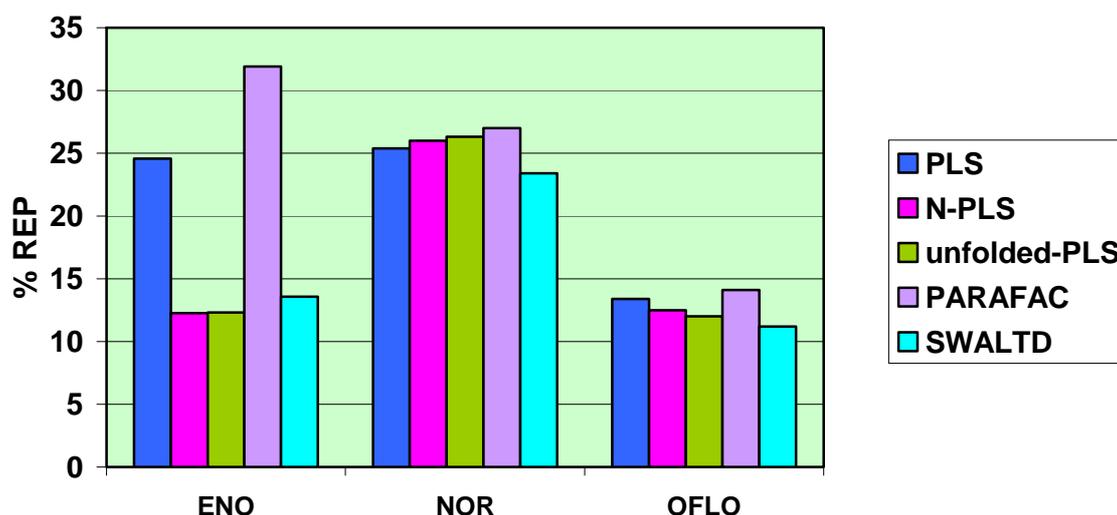


Figura VI. 7-Diagrama representativo de los valores de REP obtenidos para la determinación de ENO, NOR y OFLO en muestras de orina por los diferentes métodos multivariantes empleando la matriz de calibración A.

Con objeto de mejorar las predicciones, se planteó un cambio en la calibración. Para ello, se introducen muestras de blanco de orina, procesadas de igual modo que las muestras problemas. De este modo, se introduce un total de seis muestras de orina no contaminadas, en las que la orina procede de seis personas diferentes. Con objeto de una mejor modulación de las interferencias posibles, se reconstruyó la matriz de calibrado, introduciendo en cada uno de los patrones un fondo de orina (calibración B).

Calibración usando patrones en presencia de orina y muestras de blancos de orina (calibración B).

Tabla VI. 96.- Parámetros del ajuste mediante PLS-1 y calibración B.

Componente	Nº. Factores	PRESS	REP(%)	R ²
Enoxacino	4	3.21x10 ²	3.9	0.9940
Norfloxacin	4	3.28x10 ²	4.6	0.9960
Ofloxacin	3	6.81x10 ²	10.9	0.9880

Tabla VI. 17.- Parámetros de la calibración por N-PLS y unfolded-PLS y calibración B.

Componente	Nº. Factores ^a	PRESS	REP (%)	R ²
Enoxacino	3/3	4.82x10 ² /3.52 x10 ²	7.5/6.4	0.9997/0.9998
Norfloxacin	3/3	3.24x10 ² /3.45x10 ²	10.9/11.1	0.9993/0.9993
Ofloxacin	3/3	4.47 x10 ² /4.51x10 ²	17.8/17.6	0.9982/0.9982

^a NPLS/UPLS

Al igual que en ausencia de orina, el número de factores óptimos es de 5 y 6, en la calibración con PARAFAC y SWATLD, respectivamente.

En las condiciones indicadas en las tablas anteriores, se realizaron las predicciones de muestras de orina enriquecidas con diversas concentraciones de los tres analitos, encontrándose los resultados que se resumen en las tablas VI. 18 a VI. 22.

Tabla VI. 18.- Determinación empleando PLS-1 en muestras de orina enriquecida (calibración B).

Eno _t	Eno _c	% R	Nor _t	Nor _c	% R	Oflo _t	Oflo _c	% R
50	59.03 (6.61)	118	50	46.36 (5.74)	93	50	49.04 (0.73)	98
90	88.52 (7.79)	98	60	56.77 (1.66)	95	110	108.89 (6.60)	99
110	109.9 (0.44)	100	50	46.5 (1.12)	93	90	92.61 (1.65)	103
30	29.38 (2.11)	98	30	28.31 (2.22)	94	30	23.65 (1.79)	79
80	88.53 (1.75)	111	70	68.47 (3.70)	98	50	50.4 (0.29)	101
110	108.65 (12.27)	99	40	38.3 (3.03)	96	70	68.35 (4.55)	98
50	50.31 (9.02)	101	80	75 (3.85)	94	110	110.84 (4.33)	101
70	76.77 (8.79)	110	50	46.1 (3.23)	92	90	87.22 (2.06)	97
110	99.4 (5.75)	90	70	66.6 (3.21)	95	150	143	95
70	67.87 (2.77)	97	50	47.67 (1.61)	93.3	90	90.20 (3.82)	100
REP	10.8		7.3			5.2		

Tabla VI. 19.- Predicciones empleando N-PLS en muestras de orina enriquecida (calibración B).

Eno _t	Eno _c	% R	Nor _t	Nor _c	% R	Oflo _t	Oflo _c	% R
50	53.73 (0.66)	107	50	42.94 (2.54)	86	50	47.47 (1.25)	95
90	93.42 (2.31)	104	60	57.59 (1.24)	96	110	108.6 (6.76)	99
110	110.84 (0.66)	100.8	50	52.07 (6.43)	104	90	93.11 (3.24)	103
30	28.9 (2.52)	96	30	27.63 (1.38)	92	30	24.57 (1.46)	82
80	83.43 (2.01)	104	70	66.46 (0.71)	95	50	51.1 (0.61)	102
110	110 (10.8)	100	40	37.3 (2.86)	93	70	68.14 (4.08)	97
50	41.96 (5.37)	84	80	73.7 (3.78)	92	110	104.3 (6.34)	95
70	76.54 (7.82)	109	50	47.53 (1.09)	95	90	95.8 (10.1)	106
110	98.43 (6.77)	89	70	68.53 (3.32)	98	150	143	95
70	67.78 (1.80)	97	50	46.1 (1.86)	92	90	90.6 (5.73)	101
REP	9.6		8.1			6.1		

Tabla VI. 20.- Predicciones aplicando unfolded-PLS en muestras de orina enriquecida (calibración B).

Eno _t	Eno _c	% R	Nor _t	Nor _c	% R	Oflo _t	Oflo _c	% R
50	51.67 (0.58)	103	50	42.72 (2.59)	85	50	48 (1.52)	96
90	91.12 (2.02)	101	60	57.4 (1.25)	96	110	108.48 (6.93)	97
110	108.9 (0.15)	99	50	46.46 (0.89)	93	90	93.08 (3.44)	103
30	28.1 (2.28)	93.5	30	27.65 (1.30)	92	30	24.61 (1.51)	82
80	79.34 (1.62)	99	70	67.45 (2.71)	96	50	51.17 (0.65)	102
110	107 (10.65)	97	40	37.27 (2.80)	93	70	67.98 (4.04)	97
50	40.43 (4.66)	81	80	73.57 (3.67)	92	110	104.12 (6.32)	95
70	74.65 (7.69)	107	50	47.41 (1.10)	95	90	87.21 (1.85)	97
110	95.80 (6.41)	87	70	67.21 (2.97)	96	150	143.43	96
70	66.21 (1.87)	94	50	46 (1.96)	93	90	90.53 (6.08)	100.6
REP	10		8.3			6.2		

Tabla VI. 21.- Predicciones empleando PARAFAC en muestras de orina enriquecida (calibración B).

Eno _t	Eno _c	% R	Nor _t	Nor _c	% R	Oflo _t	Oflo _c	% R
50	52.4 (0.45)	105	50	46.21 (2.90)	92.43	50	45.69 (2.21)	91.38
90	93.33 (1.88)	103.7	60	58.85 (1.33)	98.08	110	102.7 (6.16)	93.36
110	103.61 (8.07)	94.2	50	44.45 (2.58)	88.9	90	88.05 (2.45)	97.83
30	27.92 (2.09)	93.1	30	28.36 (1.39)	94.52	30	25.74 (1.44)	85.79
80	84.62 (1.07)	105.77	70	67.04 (0.79)	95.77	50	51.36 (0.67)	102.71
110	108.38 (6.41)	98.53	40	38.36 (2.78)	95.9	70	65.16 (3.51)	93.08
50	46.81 (5.29)	93.62	80	75.09 (3.75)	93.86	110	103.31 (4.32)	93.92
70	75.94 (7.83)	108.49	50	48.62 (1.14)	97.24	90	83.15 (1.79)	92.39
110	98.19 (6.72)	89.27	70	69.92 (3.39)	99.88	150	134	89.33
70	68.32 (1.73)	98	50	47.99 (0.71)	95.98	90	86.43 (5.52)	96.04
REP	8.5		6.6			8.1		

Tabla VI. 22.- Predicciones empleando SWATLD en muestras de orina enriquecida (calibración B).

Eno _t	Eno _c	% R	Nor _t	Nor _c	% R	Oflo _t	Oflo _c	% R
50	51.5 (1.13)	103	50	44.5 (3.5)	89	50	48.15 (1.3)	96.3
90	90 (3.8)	100	60	55.5 (1.8)	92.5	110	99.7 (6.8)	91
110	111 (2.8)	101	50	51.85 (6.8)	103.7	90	88.35 (3.3)	98
30	28.8 (1.99)	96	30	27.3 (3.06)	91	30	29 (3.64)	97
80	80.6 (4.82)	101	70	69 (2.46)	99	50	52.3 (4.19)	104
110	105 (3.9)	96	40	40 (1.69)	100	70	68 (1.40)	97
50	54.1 (2.88)	108.2	80	77.5 (0.7)	97	110	104 (3.81)	94
70	75.4 (9.7)	108	50	47.6 (2.1)	95	90	84 (1.41)	93
110	101 (5.57)	92	70	68.4 (3.07)	98	150	157.5 (3.3)	105
70	77.2 (6.98)	110	50	48.5 (0.71)	97	90	87 (4.12)	97
REP	5.9		5.1			6.1		

Como observamos en estos resultados recogidos en las tablas precedentes, podemos calificarlos como aceptables, en general, siendo los más satisfactorios los obtenidos mediante SWATLD.

En la Figura VI. 8 se muestra un diagrama comparativo de los valores de recuperación medios, calculados mediante la aplicación de PLS, N-PLS, UPLS, PARAFAC y SWATLD, para cada componente y utilizando la matriz de calibrado B.

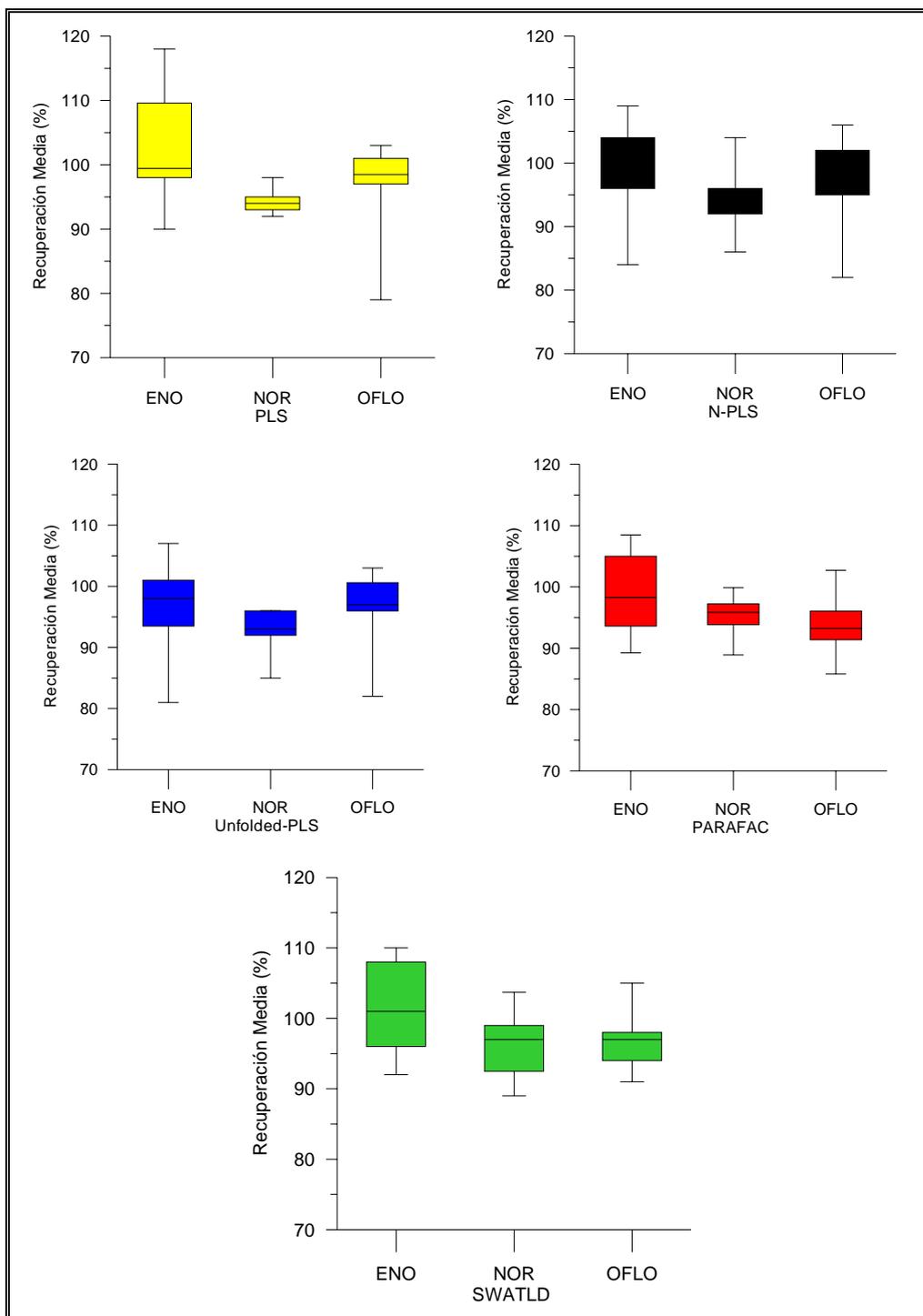


Figura VI. 8. Diagrama comparativo de los valores de recuperación media calculados por los diferentes métodos ensayados en el análisis de muestras de orina empleando la matriz de calibración B

Para tratar de dar una explicación a estos resultados se estudió si en el proceso de irradiación se produce una pérdida de la linealidad. Para ello, se preparan diferentes disoluciones que contienen los tres analitos objeto de estudio en diferentes concentraciones, registrando los correspondientes espectros de emisión en las condiciones establecidas. Seguidamente, se preparan otras disoluciones en las que, además de los analitos, está presente en la dilución adecuada, la orina. Finalmente, se registran diferentes blancos de orina. A los espectros resultantes de las muestras de los patrones se les sumó el espectro procedente de las disoluciones blanco, y este nuevo espectro se comparó con el espectro resultante de las disoluciones de orina fortificadas. En la Figura VI.9 se puede observar como al irradiar de forma conjunta la orina y los analitos, la intensidad de fluorescencia resultante es superior a la suma de la señal fluorescente emitida por la orina y los analitos de forma independiente.

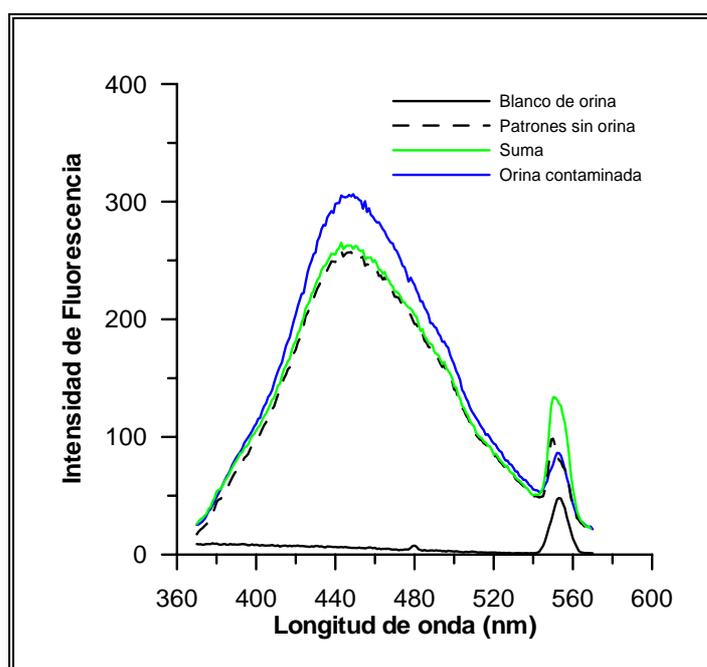


Figura VI. 9.- Espectros de emisión de orina contaminada y sin contaminar, suma de espectros de componentes individuales y espectros de blanco de orina.

Se puede observar como para un espectro de emisión obtenidos a $\lambda_{exc} = 276$ nm, la señal obtenida para la orina contaminada es notablemente superior a la teórica esperable a partir de la suma de los espectros individuales de los patrones y la orina sin enriquecer.

4. Breve resumen de las conclusiones más destacables de este capítulo

De los resultados anteriores podemos deducir la notable capacidad de resolución mostrada por los métodos de calibración multivariante para la determinación de diversos analitos en mezclas complejas como es el caso que nos ocupa. La posibilidad de eliminación de pasos previos de separación y limpiezas de las muestras proporciona rapidez y simplifica notablemente los procedimientos. Podemos afirmar que la utilización de señales de segundo orden es un camino viable que aumenta la información espectral disponible y aportada al modelo, en este caso en particular con la utilización de las matrices de fluorescencia total de los analitos como señales analíticas.

Cuando la matriz que acompaña a los analitos de interés es compleja y de naturaleza en parte desconocida, la aplicación de la denominada ventaja de segundo orden inherente a este tipo de metodologías, permite la determinación simultánea de dichos analitos en presencia de interferentes no modelados, proporcionando mejores resultados que las metodologías basadas en calibración multivariante de primer orden (métodos de dos vías) tales como PLS.

Sin embargo, el no cumplimiento de la linealidad en los datos, que es una condición impuesta por PARAFAC, puede ser la causa de que cuando esta metodología ha sido aplicada a la determinación de los analitos en muestras previamente irradiadas, la ventaja de segundo orden no ha permitido la modelación de la presencia de fondos de orina en las muestras enriquecidas. Cabe pensar, si en el proceso de irradiación las posibles interacciones generadas entre la orina y los analitos no desvirtúan los procesos de descomposición trilineal.

Sin embargo, cuando se incluye en la calibración un fondo de orina, la utilización de la mayor información espectral aportada por los datos tridimensionales permite obtener unos resultados bastante aceptables en el análisis de la orina enriquecida, sobre todo con la aplicación de SWATLD. La mejor capacidad de resolución y predicción frente a otros algoritmos de segundo orden ya ha sido previamente informada por nuestro grupo de investigación³⁶, además de presentar una mayor rapidez de cálculo y eliminar la incertidumbre en la asignación del número de factores.

En las Tablas VI.18 a VI.22, se puede observar como PARAFAC y SWATLD arrojan menores valores de REP que PLS, N-PLS y U-PLS, para ENO y NOR. Para OFLO, SWATLD proporciona mejores resultados en la predicción que PARAFAC.

La aplicación de SWATLD se puede recomendar especialmente frente a otros algoritmos de segundo orden, ya que además de mostrar una mayor rapidez en el cálculo que PARAFAC y elimina la incertidumbre en la asignación del número de factores.

³⁶ Escandar, G.; González Gómez, D.; Espinosa Mansilla, A.; Muñoz de la Peña, A.; Goicoechea, H.C.; *Analytica Chimica Acta* 506, 161, 2004

Capítulo VII.

Separación y determinación de norfloxacin, enoxacin, ofloxacin, ciprofloxacino y enrofloxacin mediante cromatografía líquida de alta eficacia.

1. Introducción.

Aunque en la segunda mitad del siglo XIX cabría asociar algunos experimentos como precursores de la cromatografía tal y como la concebimos hoy, se admite de modo general que la técnica fue desarrollada por el botánico ruso M.S. Tswett, en sus experimentos para la separación de pigmentos de plantas¹. De hecho, la primera descripción del método se produjo en una publicación suya de 1903. Posteriormente, en 1906, publicó una descripción más detallada tanto de la técnica como de las aplicaciones.

El nombre que todavía utilizamos se debe igualmente a Tswett y se deriva del griego *escribir en color*, puesto que Tswett lo acuñó como descripción de los anillos coloreados que observaba en sus columnas de creta pulverizada, aunque puntualizó que la técnica no estaba restringida a la separación de sustancias coloreadas. Durante casi 20 años, sin embargo, la cromatografía no fue apenas objeto de interés y tan sólo existen algunos artículos hacia 1915. Es al inicio de la década de los treinta cuando renace, parece redescubrirse y ya no deja de desarrollarse de modo prácticamente continuo. El inicio de esta nueva época se admite que coincide con los trabajos de Lederer y Kuhn en la separación de carotenoides en 1931. Poco después, en 1937, se publicó el primer libro dedicado a la cromatografía².

Apenas un par de años después, aparece la primera descripción de la cromatografía en capa fina (Izmailov y Shraiber) y se comienza a utilizar la cromatografía de intercambio iónico con zeolitas (Tylor y Urey en 1938). En 1941 aparece el primer artículo sobre cromatografía de partición (líquido-líquido) (A.J.P. Martin y R.L. Singe, que por su descubrimiento recibirían el premio Nobel de Química en 1952).

¹ Cela, R.; Lorenzo R.A.; Casais, M.C.; *Técnicas de separación en Química*. Ed. Síntesis. 2002, p.400

² Zechmeister, L. Cholonky, L. *Die chromatographische adsorptionsmethode*. Ed. Springer 1937

Algo más tarde, 1944, aparece el primer artículo sobre cromatografía de papel (R.Consde, A.H. Gordon y A.J.P. Martin). En 1951 se describe la separación de aminoácidos mediante resinas de intercambio iónico sintéticas (S. Moore y W.H. Stein), y un año después Alm, Williams y Tiselius, que ya en 1948 habían recibido el premio Nobel de Química por su trabajo en electroforesis y análisis de adsorción, escriben el método de elución en gradiente.

A partir de los inicios de la década de los sesenta nace la técnica de HPLC³ que ha jugado un papel fundamental en los laboratorios tanto analíticos como de química orgánica y bioquímica. De hecho, tanto esta técnica como sus predecesoras, han desempeñado un papel fundamental en los desarrollos científicos del siglo XX.

La cromatografía es, probablemente una de las técnicas más versátil de separación, aplicable a cualquier mezcla soluble o volátil. De hecho, las técnicas de separación suelen dividirse en dos grandes grupos: cromatográficas y no cromatográficas. La elección de una técnica cromatográfica concreta dependerá de la naturaleza y cantidad de muestra, del objetivo de la separación, de las limitaciones del tiempo y equipo disponible.

Puede hacerse una primera distinción entre las técnicas cromatográficas atendiendo a la integración, continuo o no, del sistema de detección. Así, la cromatografía plana no incorpora un sistema de detección, mientras que cualquier cromatógrafo de líquidos o gases lleva incorporado dicho sistema siendo, por tanto, auténticos instrumentos.

Las dificultades de la modalidad clásica (a baja presión) de la cromatografía líquida en columna (lentitud, poca eficacia en la capacidad de discriminación y número de solutos que pueden separarse, necesidad de la intervención casi constante del operador e imposibilidad de aplicar detección continua) motivaron que las aplicaciones de esta técnica fueran restringidas, en contraste con el espectacular desarrollo de la cromatografía de gases.

³ HPLC son las iniciales de *High Performance Liquid Chromatography*, que han sido traducido de formas diversas al castellano: Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR), Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (CLAE), Cromatografía Líquida de Alta Presión (CLAP), etc.

Para que la cromatografía líquida en columna sea competitiva con la cromatografía de gases es preciso, dada la diferencia en la viscosidad de la fase móvil y su capacidad para atravesar lechos empaquetados, trabajar a presiones elevadas en lugar de utilizar sólo la fuerza de la gravedad.

La elevada eficiencia analítica de esta técnica se ha conseguido gracias al empleo de columnas con un reducido tamaño de partícula y muy compactas⁴⁻⁸.

La cromatografía, que es hoy la principal técnica analítica de separación, se encuentra regida por factores termodinámicos y cinéticos. Los aspectos termodinámicos son los que determinan las características de retención y selectividad del sistema cromatográfico y corresponden a los equilibrios de distribución de los solutos entre la fase móvil y la fase estacionaria. En cuanto a los aspectos cinéticos, consideran el tiempo para el que se alcanzan los sucesivos equilibrios entre las fases, el tiempo de contacto, y la velocidad de desplazamiento diferencial de la mezcla de solutos en el lecho cromatográfico.

Aunque tanto los aspectos termodinámicos como los cinéticos influyen en todo el proceso cromatográfico, son los termodinámicos los que determinan básicamente la situación del pico, mientras que los cinéticos influyen decisivamente en el ensanchamiento de los mismos.

Cuando se desarrolla un método en HPLC, se busca una separación adecuada entre los componentes de la mezcla, en un tiempo aceptable. Para conseguir esto, se opera variando la columna, la temperatura, el caudal, pero el factor decisivo que controla la separación de los compuestos, es la composición de la fase móvil, es decir, encontrar la composición adecuada para que la separación tenga lugar en el menor tiempo posible.

⁴ L.R. Zinder, J.J. Kirkland: *An introduction to Modern Liquid Chromatography*. 2nd ed., Wiley-Interscience, N.Y., 1979

⁵ Melander, W.R.; Horvat, C.; *High-Performance Liquid Chromatography. Advances and Perspectives*. Vol. 2. Cs. Horvath, ed. Academic Press, N.Y., 1980

⁶ Snyder, L.R.; *High-Performance Liquid Chromatography. Advances and Perspectives*. Vol. 2. Cs. Horvath, ed. Academic Press, N.Y., 1983.

⁷ Berridge, J.C.; *Techniques for the Automated Optimization of HPLC Separations*. Ed. Elsevier, 1984.

⁸ Pooley, C.F.; Schuette, S.A.; *Contemporary practice of chromatography*. Ed. Elsevier, 1984.

Elección de la fase móvil

La naturaleza de la fase móvil es el factor clave para la discriminación entre solutos en HPLC, como ocurre con la temperatura en cromatografía de gases.

En la cromatografía líquida en *fase invertida* o *fase reversa*, que es nuestro caso, la fase móvil es polar y la fase estacionaria no polar. Es la que actualmente tiene mayor importancia pues más del 85% de las aplicaciones de la HPLC se basan en esta alternativa.

La fase estacionaria está constituida de sílice, como material de base, sometida a la incorporación química de una cadena hidrocarbonada larga (C-18). La retención en cromatografía de fases ligadas no polares, se debe, de manera casi exclusiva, a las interacciones hidrofóbicas no específicas soluto-fase estacionaria, es decir, al carácter hidrofóbico o hidrocarbonato del soluto. Su casi universalidad en relación con el tipo de soluto se fundamenta, por lo tanto, en el hecho de que todas las moléculas orgánicas tienen regiones hidrofóbicas, más o menos amplias en su estructura, y son capaces de interactuar con la fase estacionaria.

La selectividad, en cambio, se basa en las interacciones específicas entre el soluto y la fase móvil, ya sean de tipo polar, de formación de enlaces de hidrógeno, o mediante equilibrios secundarios provocados al variar la composición de la fase móvil (ácido-base, formación de complejos o pares iónicos, adición de complejos metal-ligando o reactivos quirales para separar isómeros ópticos, etc.).

Las propiedades básicas que nos interesan de la fase móvil son la fuerza o capacidad de desplazamiento que posea sobre los solutos y su selectividad.

En cromatografía en fase invertida, dado que la retención de los solutos en la fase estacionaria ocurre fundamentalmente a través de la zona no polar de los solutos, la relación entre fuerza y capacidad de desplazamiento y polaridad de la fase móvil es inversa; así el agua es un eluyente con mínimo poder de elución y debe mezclarse con disolventes menos polares para fluir solutos fuertemente retenidos por la fase estacionaria no polar. En general, la estrategia en las separaciones cromatográficas consiste en:

- Ajustar la fuerza de la fase móvil a un nivel constante para que la retención de los solutos en la fase estacionaria y su tiempo de permanencia en la columna sea el adecuado para no alargar excesivamente el cromatograma y evitar la dispersión de los solutos.
- Modificar la composición de la fase móvil hasta conseguir la selectividad necesaria para lograr la discriminación requerida entre solutos.

Después de pasar a través de la columna, los analitos separados llegan al detector que proporciona los datos de los compuestos en forma de señal eléctrica. Hasta el momento no hay un detector universal para HPLC.

Parámetros cromatográficos

Tiempo de retención (t_R): Es el tiempo que tarda el analito en pasar a través del sistema bajo unas determinadas condiciones cromatográficas. La retención puede medirse en tiempos, volúmenes o distancias.

Factor de capacidad (k'): Es el parámetro más comúnmente usado para caracterizar el comportamiento de un soluto en un sistema cromatográfico, cuantificando su retención en dicho sistema. Se define como:

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} = \frac{t_R}{t_0} \quad \text{Ecuación 1}$$

donde t_R es el tiempo de retención del compuesto, t_0 es el tiempo muerto o tiempo transcurrido desde la inserción de un trazador, no retenido en el sistema, hasta su salida. En un sistema multicomponente, se intenta mantener el valor de k' entre 1 y 10^9 .

Factor de separación (α): Está relacionado con la separación o discriminación entre solutos, es un parámetro definitorio de la selectividad cromatográfica entre dos analitos y se define como:

$$\alpha_{1/2} = \frac{t'_{R_2}}{t'_{R_1}} = \frac{k_2}{k_1} \quad \text{Ecuación 2}$$

Sin embargo, este factor no es decisivo para asegurar la separación completa de los picos ya que no tiene en cuenta el ensanchamiento de banda y, por tanto, los posibles solapamientos. Estos aspectos si son tenidos en cuenta por otro factor más utilizado para definir la capacidad de un sistema cromatográfico para separar dos sustancias, que es la resolución cromatográfica.

⁹ Murphy, I.B.; Stutte, S.A.; *Contemporary practice of chromatography*. Ed. Elsevier, 1978.

Resolución cromatográfica (R_s): Nos da el grado de separación de un componente con respecto a otro, se define como:

$$R_s = \frac{t_{R_2} - t_{R_1}}{\frac{1}{2}(w_{b_1} + w_{b_2})} \quad \text{Ecuación 3}$$

donde w_{b_1} y w_{b_2} son los anchos de banda de ambos picos a línea base. En una separación considerada satisfactoria es normalmente aceptado un valor de R_s de 1, correspondiente a una separación entre picos del orden del 94%¹⁰ aunque para que exista una resolución prácticamente total (resolución a línea base), R_s debe ser igual o superior a 1,5.

Los objetivos que se persiguen con la elección de la fase móvil adecuada, es conseguir que los factores de capacidad de los analitos tengan valores adecuados, comprendidos entre 1 y 10, y que la resolución entre los diferentes picos sea igual o superior a 1.

Selección del caudal de fase móvil

Se ha comentado que la cromatografía es una técnica analítica de separación con un doble fundamento termodinámico y cinético.

Los aspectos termodinámicos son los que rigen el equilibrio de distribución o reparto de los solutos-analitos entre las dos fases, móvil y estacionaria, por tanto son los responsables de características tan importantes como la retención y la selectividad.

¹⁰ Pang, Q.Y.; Lu, Y., Yu, L.; Hai, H.; Tian, Z.H. ; Yaowu. *Fenxi. Zazhi*,18,259, 1998

Los aspectos cinéticos juegan en cromatografía un doble papel; por una parte debe considerarse el tiempo en que se alcanza el equilibrio de distribución en cada porción del sistema y, por otra parte, la velocidad de desplazamiento diferencial de la mezcla de solutos en el lecho cromatográfico es la responsable última en la separación. Sobre ella influyen aspectos termodinámicos y aspectos físicos relacionados con la dispersión axial, flujo a través del medio poroso, etc.

Las características cinéticas del proceso son claves para definir el ensanchamiento de banda o ancho de pico que es el que determina, en definitiva, la eficacia del sistema cromatográfico. En general, los términos que contribuyen a ésta corresponden a la difusión por remolino, difusión longitudinal y a la resistencia a la transferencia de materia en la fase móvil y estacionaria que, a su vez, van a depender de la velocidad de flujo o del caudal de fase móvil a través de la fase estacionaria.

Número de platos teóricos (N): La eficacia de una columna se mide por el número de platos teóricos, y es un valor adimensional.

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{w_b} \right)^2 \quad \text{Ecuación 4}$$

donde w_b es la anchura del pico cromatográfico a línea base y t_R es el tiempo de retención del soluto. Tanto t_R como la anchura se miden en las mismas unidades. En un cromatograma, la anchura de pico usualmente se expresa en unidades de tiempo debido a que la abscisa del mismo representa unidades de tiempo. Sin embargo, también se puede expresar en unidades de volumen multiplicado por el valor del flujo de fase móvil (F):

$$w_{vol} = w_{tiempo} F \quad \text{Ecuación 5}$$

Otro método de estimación de N, es determinar $w_{1/2}$, la anchura de pico a mitad de su altura máxima. El número de platos teóricos viene dado, entonces, por la expresión:

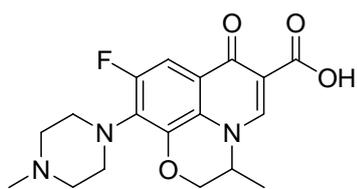
$$N = 5,54 \left(\frac{t_R}{w_{1/2}} \right)^2 \quad \text{Ecuación 6}$$

Un plato teórico es un segmento microscópico de la columna donde tiene lugar el equilibrio de distribución entre el soluto en las fases móvil y estacionaria.

Generalmente, la eficacia de una columna en HPLC aumenta a medida que disminuye el tamaño de las partículas dentro de la columna. Así, las columnas comerciales de fase reversa de sílice ligada tienen alrededor de 50.000 platos m^{-1} con partículas de 5 μm y la mitad de platos para partículas de 10 μm . El número de platos necesario depende del tipo de trabajo a realizar; muchos análisis de rutina en HPLC son suficientemente eficaces aún cuando el número de platos teóricos es bastante más bajo que los citados anteriormente.

El objetivo del trabajo recogido en este capítulo ha sido el desarrollo y puesta a punto de procedimientos cromatográficos mediante la utilización de cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa y detección fluorimétrica, de diversas fluoroquinolonas de las denominadas de segunda generación, con el objeto de llevar a cabo su determinación en fluidos biológicos, concretamente orina y suero humanos.

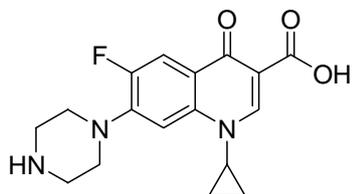
Las intensas propiedades fluorescentes que presentan estos analitos, así como la posibilidad de obtener fotoproductos a partir de las mismas previa irradiación UV, aumentando así drásticamente las propiedades fluorescentes de las fluoroquinolonas de partida, abre un amplio campo de investigación en cromatografía, dada la diferente naturaleza de los compuestos formados y la variedad en cuanto a la naturaleza polar de los mismos. Las fluoroquinolonas estudiadas han sido: enoxacino (ENO), ofloxacino (OFLO), norfloxacino (NOR), enrofloxacino (ENRO) y ciprofloxacino (CIPRO), todas ellas usadas en tratamientos terapéuticos y cuyas estructuras aparecen en el siguiente esquema:



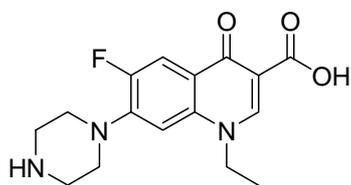
Ofloxacino



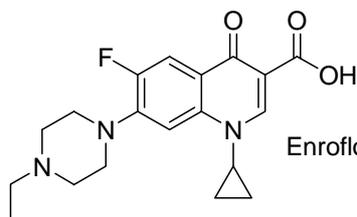
Enoxacino



Ciprofloxacino



Norfloxacino



Enrofloxacino

2. Parte experimental.

Como paso previo en el establecimiento de las mejores condiciones experimentales con las que llevar a cabo la separación de este grupo de analitos, se realizaron diferentes estudios basados en la modificación tanto de la composición de la fase móvil, como de los parámetros instrumentales.

Influencia de la acidez

Se realizó el estudio correspondiente a la influencia de la acidez de la fase acuosa. Teniendo en cuenta las propiedades ácido base ya establecidas previamente para estas fluoroquinolonas (capítulo II), inicialmente se prepararon tampones fosfato de concentración 30 mM y de pH comprendidos entre 2.5 y 5.0, zona de acidez en la cual cabe esperar la existencia de formas predominantes de las fluoroquinolonas. Utilizando una fase móvil constituida por acetonitrilo-tampón fosfato (20:80 v/v), se estudió el efecto que ejerce la modificación del pH en el proceso cromatográfico.

Inicialmente, se realizó un seguimiento fluorimétrico utilizando como $\lambda_{exc} = 277$ nm y $\lambda_{em} = 444$ nm, inyectando en todos los casos 20 μ L de disolución previamente filtrada a través de filtros de nylon de 0.22 μ m conteniendo 200 ppb de ENO, NOR, OFLO, CIPRO y ENRO. En la Tabla VII. 1 se muestran los tiempos de retención y resoluciones obtenidas, para las fluoroquinolonas en estudio.

Tabla VII. 1.- Tiempos de retención y resoluciones obtenidas a diferentes valores de pH

pH	Tiempo de retención (minutos)									
	ENO		NOR		OFLO		CIPRO		ENRO	
	t _R	t _R	R _{2/1}	t _R	R _{3/2}	t _R	R _{4/3}	t _R	R _{5/4}	
2.57	2,051	2,236	0,84	2,236	*	2,425	0,72	3,129	1,95	
3.05	2,049	2,235	0,85	2,235	*	2,424	0,69	3,146	1,72	
3.54	2,045	2,233	0,83	2,280	*	2,428	0,65	3,186	1,54	
4.00	2,072	2,267	0,80	2,374	*	2,471	0,58	3,327	1,14	
4.95	2,103	2,310	0,71	2,300	*	2,487	0,36	5,002	1,10	

* no cuantificable debido al elevado solapamiento entre los picos 2 y 3.

Como se puede observar, aparecen picos diferenciados para todos los componentes excepto para el OFLO que esta totalmente solapado con el pico del NOR (pico 2). La resolución aumenta para NOR/ENO a medida que aumenta el pH, pero sin embargo disminuye para los otros dos picos medibles, los correspondientes a CIPRO y ENRO. Así, se toma como compromiso un valor inicial de pH de 3.05, para llevar a cabo los posteriores estudios.

Selección de la composición de la fase móvil. Selección de modificadores orgánicos

Se ha estudiado como influye en la separación cromatográfica la naturaleza del disolvente orgánico adicionado. Para ello se ha analizado la influencia de acetonitrilo, metanol y tetrahidrofurano (THF); empleando el tampón fosfato a pH 3.05 establecido en la experiencia anterior.

❖ **Influencia de la presencia de acetonitrilo**

Se ha comprobado que a porcentajes muy elevados de acetonitrilo, por encima de un 25 %, los cinco analitos estudiados eluyen en solo dos picos. Es por debajo de este porcentaje cuando se empiezan a diferenciar. En este disolvente el analito que presenta mayor solapamiento es el OFLO que eluye al mismo tiempo que el NOR. Además, los picos presentan un mal desarrollo ya que se muestran anchos y asimétricos. En la siguiente tabla se muestran los tiempos de retención y resolución para diferentes porcentajes de acetonitrilo.

La mejor resolución se obtiene cuando el contenido de acetonitrilo en la fase móvil es de un 13 %, ya que para dicho valor la resolución CIPRO/NOR llega a alcanzar el valor de 1, sin embargo los tiempos de retención son bastante elevados. En la siguiente figura VII.1 se representan los cromatogramas que se obtienen para composiciones de fase móvil de 13 y 16 % de acetonitrilo, respectivamente.

Tabla VII. 2.- Influencia del disolvente orgánico presente en la fase móvil en la retención de los analitos ENO, NOR, CIPRO y ENRO.

ACETONITRILO (%)	ENO		NOR			CIPRO			ENRO		
	t_R	k'	t_R	K'	R_s	t_R	k'	R_s	t_R	k'	R_s
30	El cromatograma presenta dos únicos picos										
25	El cromatograma presenta dos únicos picos										
20	2,06	0,81	2,25	0,97	0,86	2,45	1,15	0,72	3,18	1,79	1,77
18	2,46	1,16	2,76	1,42	1,12	3,06	1,68	0,85	4,18	2,67	2,12
16	3,13	1,74	3,61	2,17	1,39	4,07	2,57	0,98	5,87	4,14	2,36
13	5,55	3,87	6,71	4,88	1,77	7,79	5,83	1,06	12,4	9,87	2,61

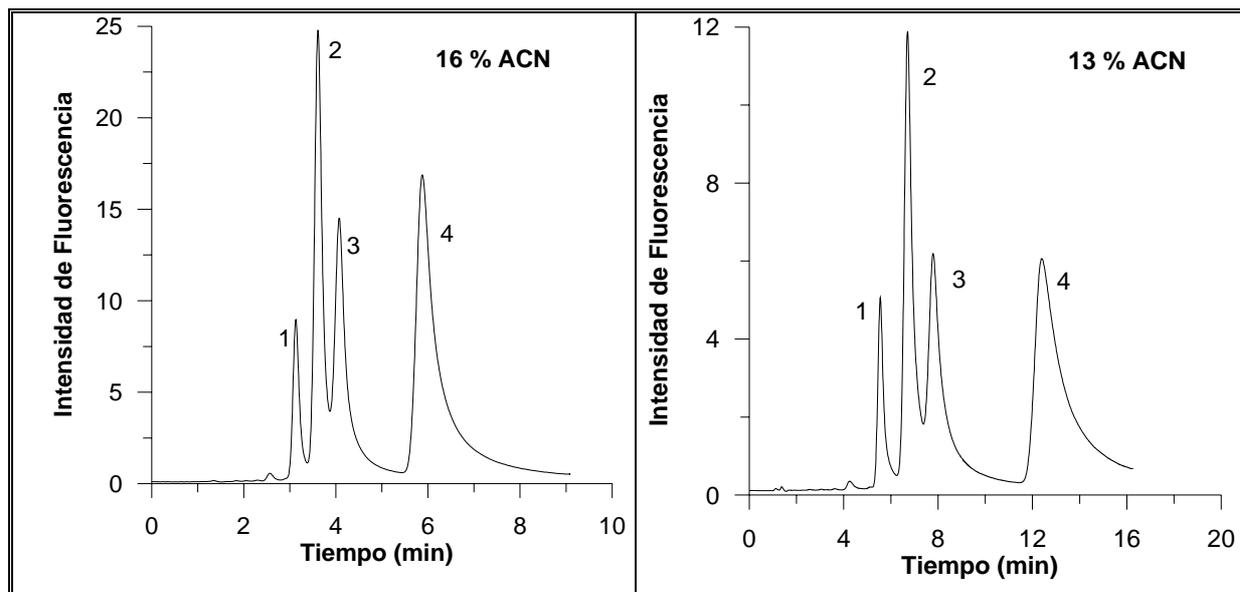


Figura VII. 1.- Cromatogramas para ENO (1), NOR (2), CIPRO (3) y ENRO (4), empleando como modificador orgánico acetonitrilo.

❖ Influencia de la presencia de metanol

De acuerdo con los resultados obtenidos en el estudio anterior, se calculó que porcentaje de metanol se debía de añadir al tampón fosfato para obtener una mezcla equivalente, siendo éste de un 20 % en metanol. Cuando se estudiaron variaciones en la proporción de metanol, en torno a este porcentaje, se comprobó que, con respecto al disolvente anterior, los picos cromatográficos poseen una menor cola, y empieza a hacerse más evidente el pico del OFLO, que se separa ligeramente del NOR, pero siendo necesario aún considerarlo como un único pico. Los picos en general aparecen mal desarrollados presentando notables colas. En la siguiente tabla se muestran los tiempos de retención y los valores de resolución para los diferentes porcentajes de metanol estudiados.

Tabla VII. 3.- Influencia de la presencia de metanol en la retención de los analitos ENO, NOR, CIPRO y ENRO.

METANOL (%)	ENO		NOR			CIPRO			ENRO		
	t_R	k'	t_R	K'	R_s	t_R	k'	R_s	t_R	k'	R_s
	(min)		(min)			(min)			(min)		
25	6,16	4,40	7,16	5,28	1,42	8,32	6,30	1,28	9,75	7,56	1,06
20	11,1	8,77	12,8	10,2	2,45	15,6	12,7	1,61	20,9	17,3	2,11
18	16,0	13,0	18,1	14,9	1,19	22,4	18,6	1,65	30,4	25,7	2,13
16	20,9	17,3	23,4	19,5	1,22	29,3	24,7	2,03	41,9	35,7	3,09

Podemos observar que los mejores valores de resolución se obtienen para un porcentaje de metanol de un 20 %. En la siguiente figura podemos observar el cromatograma que se obtiene en estas condiciones.

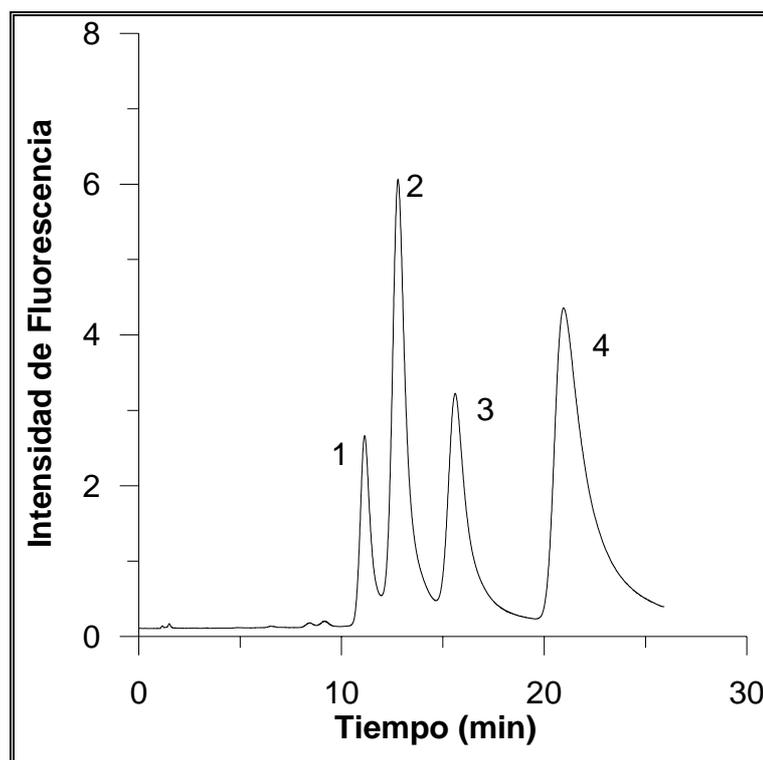


Figura VII. 2.- Cromatograma obtenido para ENO (1), NOR (2), CIPRO (3) y ENRO (4), empleando como disolvente orgánico metanol en un 20 %.

❖ **Influencia de la presencia de tetrahidrofurano**

Una vez calculado que porcentaje de THF es necesario para obtener una mezcla equivalente, éste se fijó en un 11.5 %, estudiándose variaciones de % THF en torno a este valor. Con respecto a los dos disolventes anteriores, se observa que con THF los picos están bien desarrollados, no presentan colas notables y son prácticamente simétricos. El pico correspondiente al OFLO deja de estar solapado con el NOR ya que este último queda notablemente retenido en este medio apareciendo a tiempo superiores al ENRO, sin embargo CIPRO, no se puede determinar ya que esta totalmente solapado con NOR.

En la siguiente tabla VII.4 se muestran los tiempos de retención y valores de resolución para los diferentes porcentajes de THF estudiados.

Tabla VII. 4- Influencia de la presencia de THF en la resolución de ENO, OFLO, ENRO y NOR.

THF (%)	ENO		OFLO			ENRO			NOR		
	t _R (min)	k'	t _R (min)	k'	R _s	t _R (min)	k'	R _s	t _R (min)	k'	R _s
12	2.29	1.01	2.77	1.43	1.74	3.29	1.88	1.73	3.58	2.14	0.85
8	3.46	2.03	4.32	2.78	2.46	5.34	3.68	2.65	6.07	4.32	1.29
6	4.85	3.25	6.00	4.26	2.37	7.94	5.96	3.29	8.76	6.68	1.18

Con el empleo de THF se obtienen los mejores resultados de resolución, pudiéndose considerar como aceptables para las cuatro fluoroquinolonas mostradas en la tabla VII.4 cuando se emplea un 8 % de THF.

En la siguiente figura podemos observar el cromatograma que se obtiene en estas condiciones experimentales.

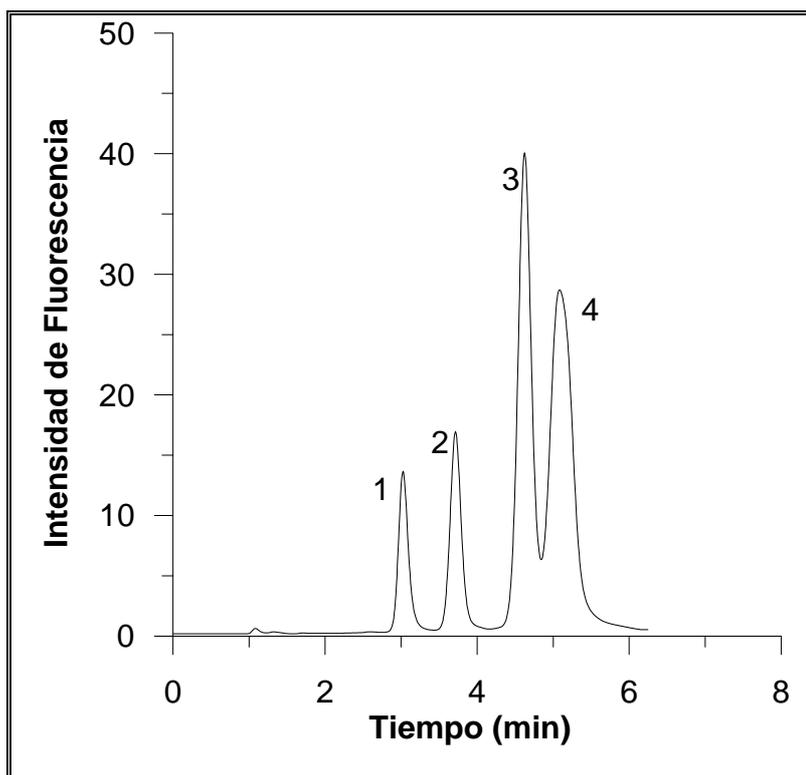


Figura VII. 3.- Cromatograma obtenido para ENO (1), OFLO (2), ENRO (3) y NOR (4) utilizando como fase móvil tampón fosfatos (pH=3.05) y THF (92/8).

En ninguno de los disolventes presentados conseguimos la separación de las cinco fluoroquinolonas.

Con objeto de resolver la mezcla, se realizaron estudios empleando mezcla de disolventes con el mismo poder de desplazamiento. En ninguno de los casos, se consiguió una resolución entre los cinco analitos. La posibilidad de emplear una elución en gradiente también se ensayó. Para ello, se establecieron diferentes gradientes THF-metanol y gradientes lineales de THF. En el primer caso se consigue una resolución de cuatro quinolonas; ENO, OFLO, ENRO y NOR. El CIPRO eluye en las mismas condiciones del NOR, por lo que hace inviable su separación. El empleo de este gradiente presenta el problema en la repetitividad dada las condiciones poco robustas del procedimiento.

Finalmente, descartamos la posibilidad de separar las cinco quinolonas por esta metodología. Empleando una fase móvil constituida por 92% de tampón fosfato 30 mM (pH=3.05) y 8% THF, procedimos a establecer un procedimiento para analizar ENO, OFLO, ENRO y NOR, descartando CIPRO que es quizás la fluoroquinolona más antigua y que, por tanto, están descritos en la bibliografía más métodos para su análisis.

En la figura VII.4 se muestra el cromatograma obtenido en las condiciones iniciales fijadas, utilizando diferentes longitudes de onda para el seguimiento de la separación.

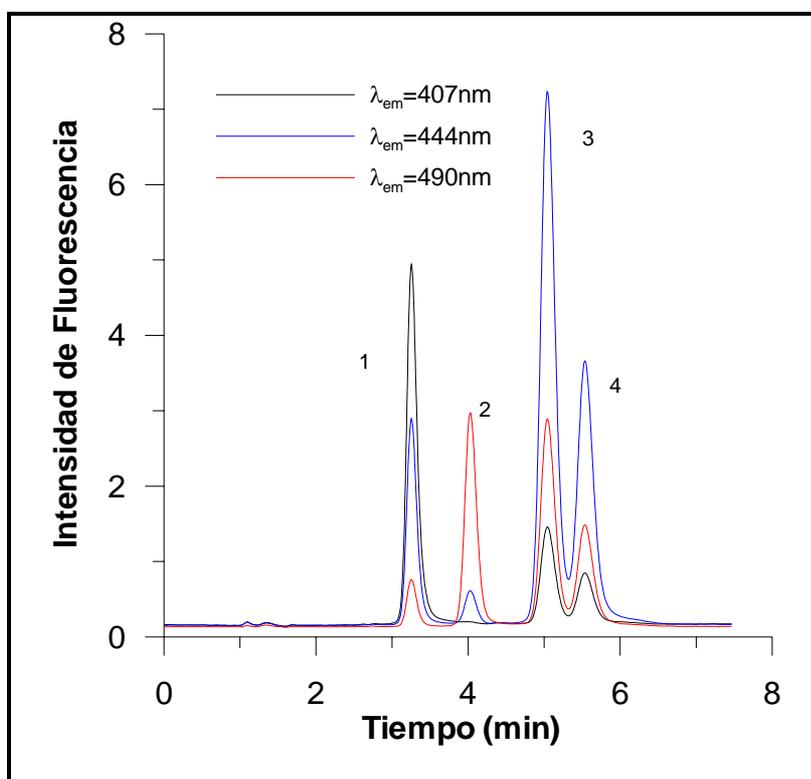


Figura VII. 4.- Cromatograma obtenido para ENO (1), OFLO (2), ENRO (3) y NOR (4) en las condiciones propuestas, a diferentes longitudes de onda de emisión ($\lambda_{exc} = 277 \text{ nm}$)

La disponibilidad de un detector fluorimétrico de barrido rápido nos permite elegir la longitud de onda de emisión óptima para cada analito. Así, se procedió a estudiar diferentes señales para cada analito y establecer la longitud de onda más adecuada en función de parámetros estadísticos, de calibración.

Linealidad

Se procedió al establecimiento del intervalo de concentraciones, para el cual estos analitos presentan una relación lineal entre la concentración y la señal analítica. El tratamiento estadístico de los resultados se ha realizado mediante el empleo de un software desarrollado y descrito en este trabajo de investigación (apéndice 1 de esta Memoria).

Establecimiento de la linealidad para la determinación de ENO, OFLO, ENRO y NOR.

En las figuras VII.5 a VII.8 se muestra la rectas de calibrado obtenidas para las cuatro fluoroquinolonas a diferentes longitudes de onda de emisión. Los parámetros estadísticos que se han calculado aparecen resumidos en las tablas VII.5 a VII. 8

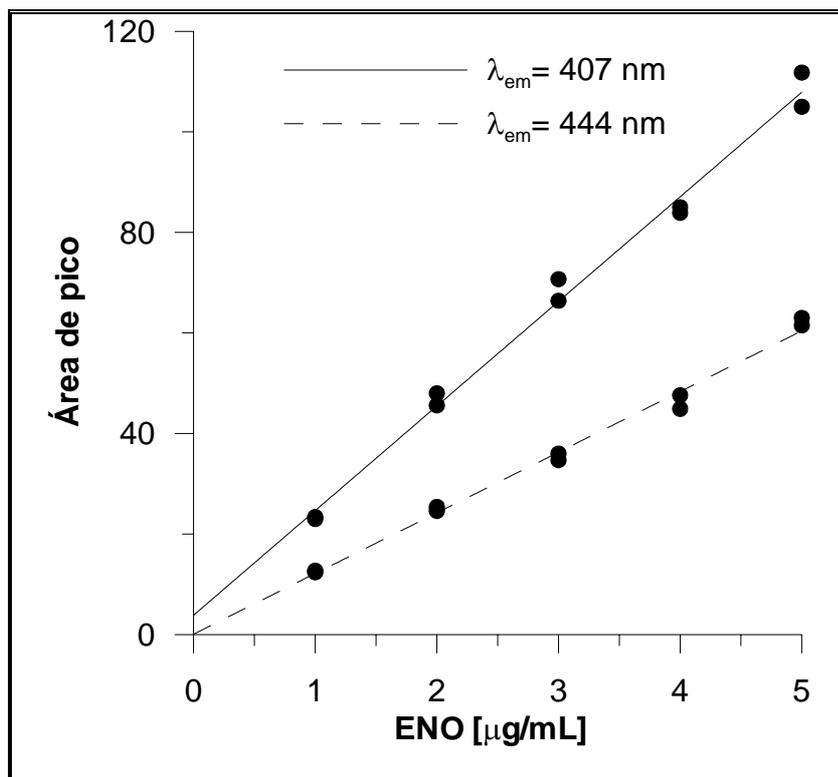


Figura VII. 5.- Recta de calibrado para ENO

Tabla VII. 5.- Parámetros estadísticos para la determinación de ENO

	407 nm	444nm
Ordenada origen (S _o)	3.8±0.7	0.1±1.3
Pendiente (Uf mL/µg) (S _p)	20.8±2.2	12.1±0.4
Coefficiente de regresión	0.996	0.996
S (R, c)	2.93	1.76
Linealidad (%)	97	97
Límite de detección Clayton (µg/mL)	0.45	0.50
Límite de detección Winef. Y Long (k=3) (µg/mL)	0.31	0.32
Sensibilidad (µg/mL)*	0.14	0.15

* Expresada como γ^{-1}

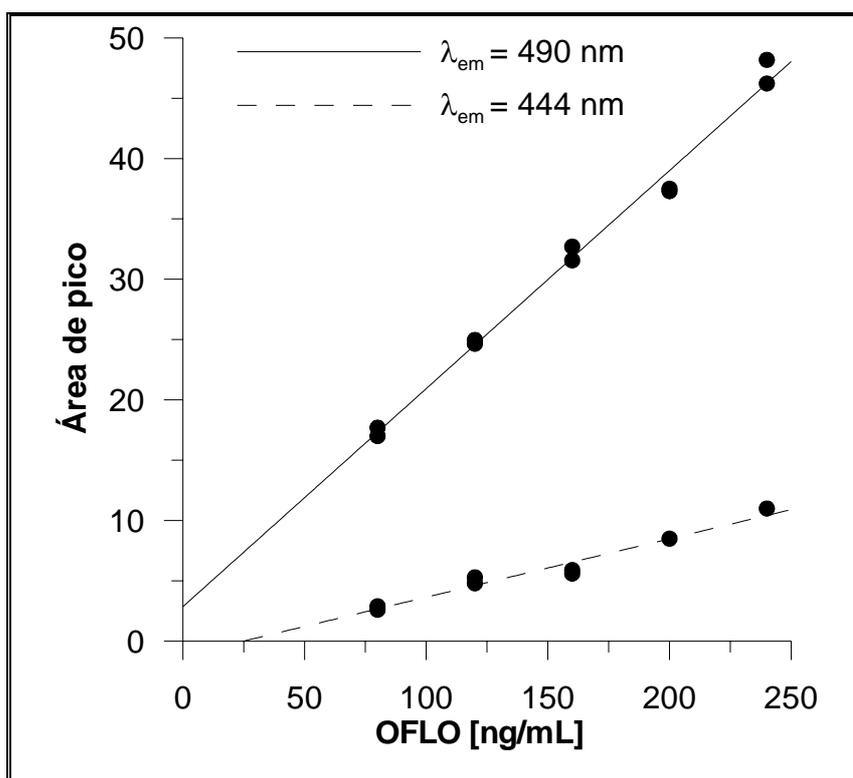


Figura VII. 6.- Recta de calibrado para OFLO

Tabla VII. 6.- Parámetros estadísticos para la determinación de OFLO

	490 nm	444 nm
Ordenada Origen (So)	2.9±1.1	-2.0±0.9
Pendiente (Uf mL/ng) (Sp)	0.18±0.01	0.05±0.05
Coef. Regresión	0.995	0.969
S (R,c)	1.13	0.918
Linealidad (%)	96.5	90.4
Límite de detección Clayton (ng/mL)	18.0	68.4
Límite de detección Winefordner y Long (k=3) (ng/mL)	25.2	48.2
Sensibilidad (ng/mL)*	6.3	16.7

* Expresada como γ^{-1}

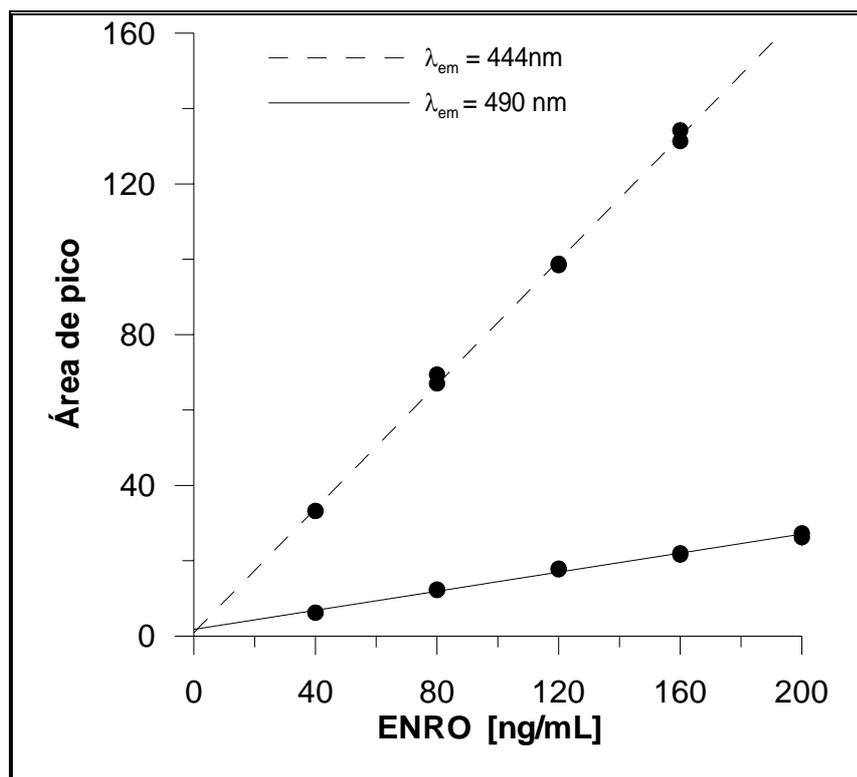


Figura VII. 7.- Recta de calibrado para ENRO

Tabla VII. 7.- Parámetros estadísticos para la determinación de ENRO

	444 nm	490 nm
Ordenada Origen (So)	0.9±1.3	1.8±0.5
Pendiente (UF mL/ng) (Sp)	0.823±0.012	0.126±0.004
Coef. Regresión	0.998	0.997
S (R,c)	1.55	0.67
Linealidad (%)	98	97
Límite de detección Clayton (ng/mL)	7.4	18.0
Límite de detección Winefordner y Long (k=3) (ng/mL)	4.9	11.8
Sensibilidad (ng/mL)*	1.9	5.3

* Expresada como $\gamma-1$

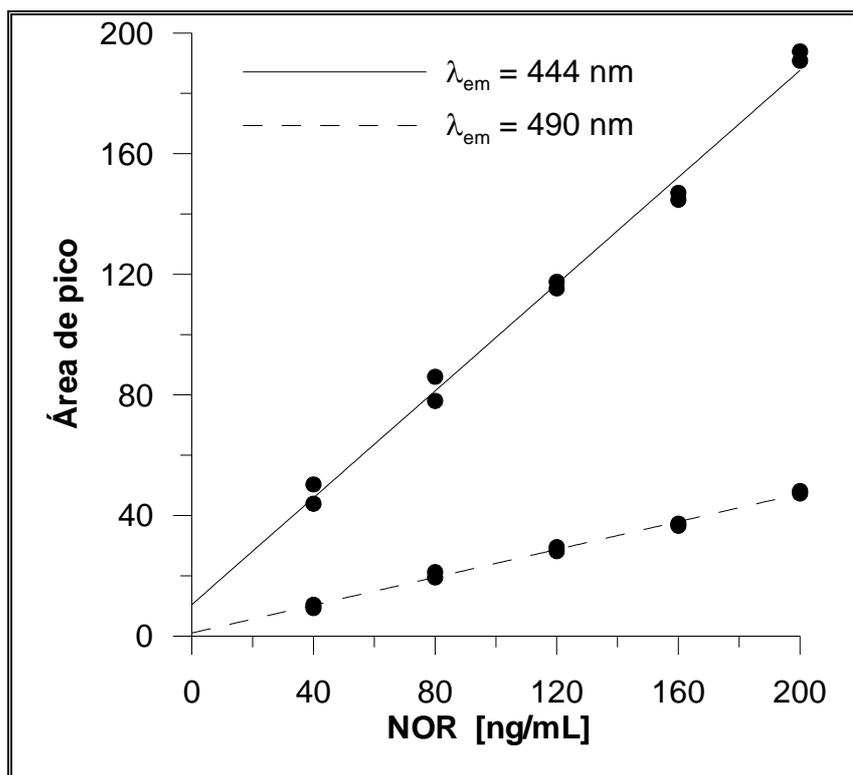


Figura VII. 8.- Recta de calibrado para NOR

Tabla VII. 8.- Parámetros estadísticos para la determinación de NOR

	444 nm	490 nm
Ordenada Origen (So)	10.4±3.6	1.0±0.7
Pendiente (UF mL/ng) (Sp)	0.231±0.006	0.886±0.03
Coef. Regresión	0.998	0.996
S (R,c)	0.997	4.86
Linealidad (%)	98	97
Límite de detección Clayton (ng/mL)	14.7	18.8
Límite de detección Winef. y Long (k=3) (ng/mL)	9.6	12.3
Sensibilidad (ng/mL)*	4.3	5.5

*Expresada como γ^{-1}

En la figura VII.9 se ha representado una proyección bidimensional de la relación intensidad de fluorescencia λ_{em} (nm) - tiempo (min) cuando se mantiene una λ_{exc} constante a 277 nm. Sobre las curvas de nivel obtenidas se puede observar la suficiente separación existente entre los analitos eluidos.

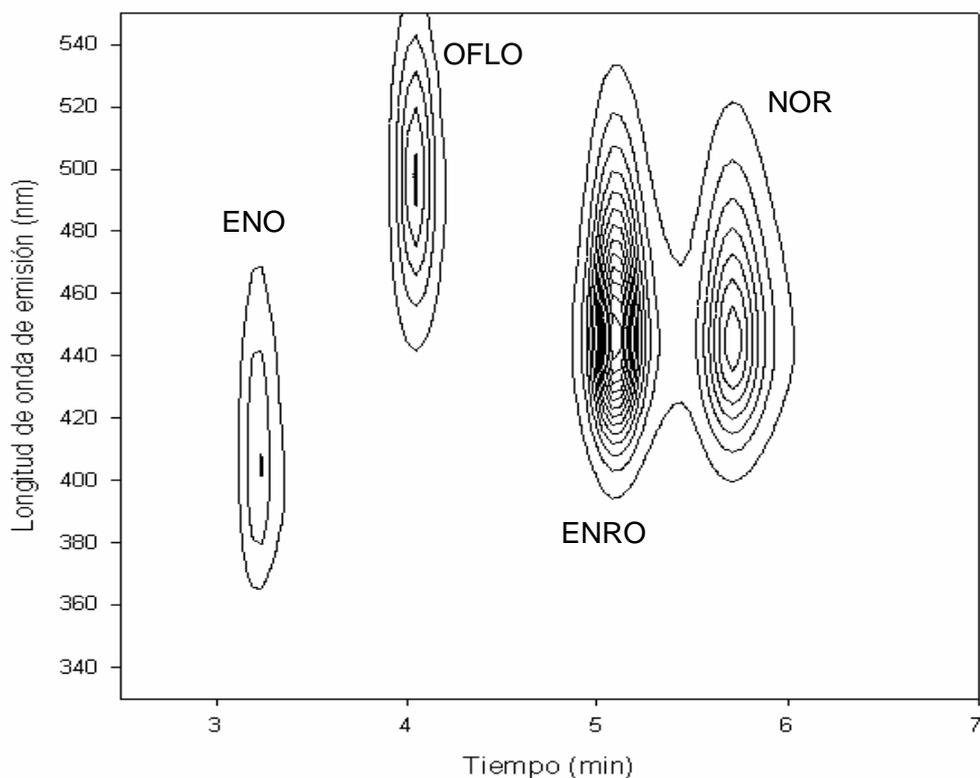


Figura VII. 9. Proyección bidimensional de la intensidad de fluorescencia en función de la λ_{em} (nm) – tiempo (min) a $\lambda_{exc} = 277$ nm, de una muestra conteniendo enoxacino, ofloxacino, enrofloxacino y norfloxacino.

Repetitividad.

Para llevar a cabo este estudio en un mismo día se registraron un total de diez cromatogramas de diez mezclas conteniendo 3.0 µg/mL de ENO y 160, 120 y 120 ng/mL de OFLO, ENRO y NOR, respectivamente.

En todos los casos, se excitó a 277 nm, y se fijó la emisión en 407 nm para ENO, 490 nm para OFLO y 444 nm para NOR y ENRO. Ya que a esta longitudes, los analitos presentan mayor sensibilidad.

Como podemos observar en la tabla VII.9, los valores correspondientes a las desviaciones estándar son adecuados en todos los casos. Los analitos se separan en tan solo 6 minutos y los valores de resolución calculados están en todos los casos por encima de 1.

Tabla VII. 9 Estudios de repetitividad en la determinación cromatográfica de ENO, OFLO, ENRO y NOR.

	ENO	OFLO	ENRO	NOR
Conc. Media	2.89	152	119	119
± SD	± 0.03	± 1	± 1	± 2
t _R (min)	3.44	4.29	5.40	6.03
± SD	± 0.01	± 0.02	± 0.02	± 0.03
W _{1/2} (min)	0.168	0.187	0.234	0.257
± SD	± 0.001	± 0.002	± 0.002	± 0.002
Resolución		2.40	2.63	1.27
± SD	-----	± 0.01	± 0.01	± 0.01

SD: Desviación estándar (n = 10)

3. Determinación de enoxacino, ofloxacino, enrofloxacino y norfloxacino en orina

El procedimiento cromatográfico anteriormente descrito, ha sido aplicado a la determinación de los analitos objeto de estudio en orina.

Debido a que las quinolonas estudiadas se eliminan principalmente por vía urinaria, las concentraciones que podemos encontrar de estos antibióticos en dicho fluido son elevadas. Es por ello que es necesario realizar en primer lugar una dilución de la muestra.

Orinas procedentes de individuos de edades comprendidas entre 25-30 años se contaminaron con los analitos en estudio, simulando las concentraciones biológicas y, posteriormente, se les realizó una dilución total de 500 veces (1.0 mL en 25 mL, y 0.5 en 10 mL) antes de ser inyectadas en el sistema cromatográfico.

En las condiciones optimizadas previamente para el método cromatográfico se obtuvieron los cromatogramas correspondientes a muestras de orina, enriquecidas y sin enriquecer, con las fluoroquinolonas en estudio.

Se puede observar, Figura VII.10 una adecuada definición de los picos de los analitos en presencia de orina y la aparición de una señal, correspondiente a los componentes de la orina y de naturaleza desconocida, a tiempos superiores a los 8 minutos y que, como consecuencia, no interferirá en la determinación propuesta.

Una vez establecida la posible viabilidad del método, a continuación se prepararon muestras de orina, procedentes de individuos no tratados con estos antibióticos para llevar a cabo su análisis.

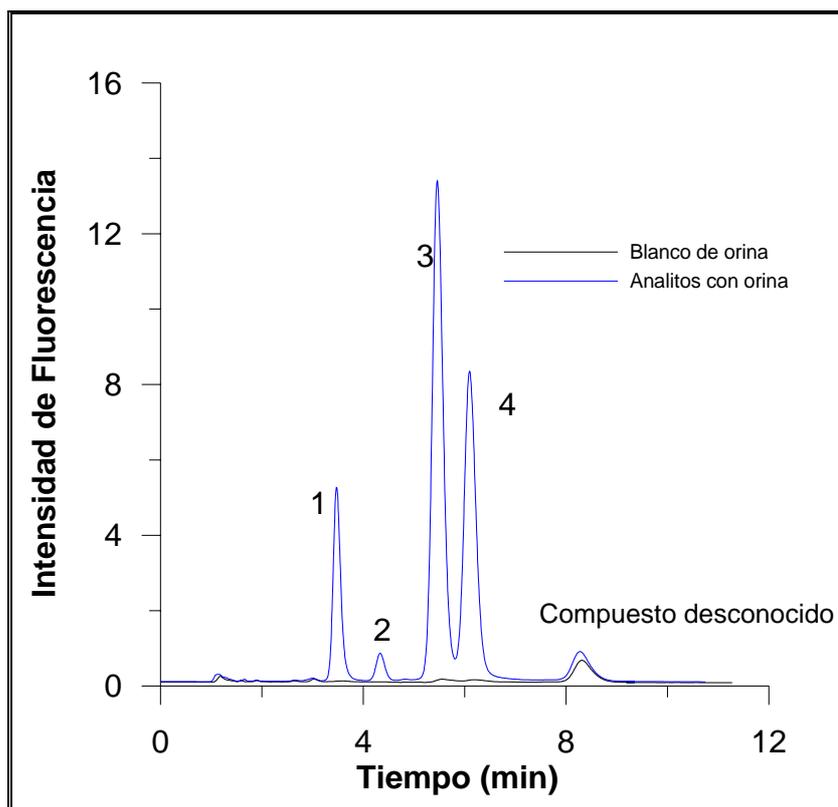


Figura VII. 10- Cromatogramas de una muestra de orina enriquecida con ENO 3.00 ppm (1), OFLO 0.16 ppm (2), ENRO 0.16 ppm (3) y NOR 0.16 ppm (4) y sin enriquecer, obtenidos empleando las condiciones experimentales propuestas ($\lambda_{exc.} = 277 \text{ nm}$; $\lambda_{em.} = 444 \text{ nm}$).

En un matraz de 25 mL se depositó 1 mL de orina fresca, se contaminó de forma apropiada con ENO, OFLO, ENRO y NOR, de manera que se simula una concentración excretada de estos fármacos en orina de 50 $\mu\text{g/mL}$. Se enrasa con agua milli-Q y se toman porciones de 0.5 mL en matraces de 10 mL, se adicionan diferentes volúmenes de disoluciones patrón de los analitos y finalmente se enrasa con tampón fosfato (30.0 mM; pH=3.05). Así, se prepararon un conjunto de cuatro patrones de diferentes concentraciones conteniendo esta orina contaminada, y se inyectaron por triplicado en el sistema cromatográfico. De forma paralela se inyectaron patrones en ausencia de orina, con objeto de comparar ambas experiencias. A partir de las rectas de adición patrón se calcularon las correspondientes recuperaciones, obteniéndose los resultados mostrados en las figuras VII.11 a VII.14.

a) Enrofloxacino

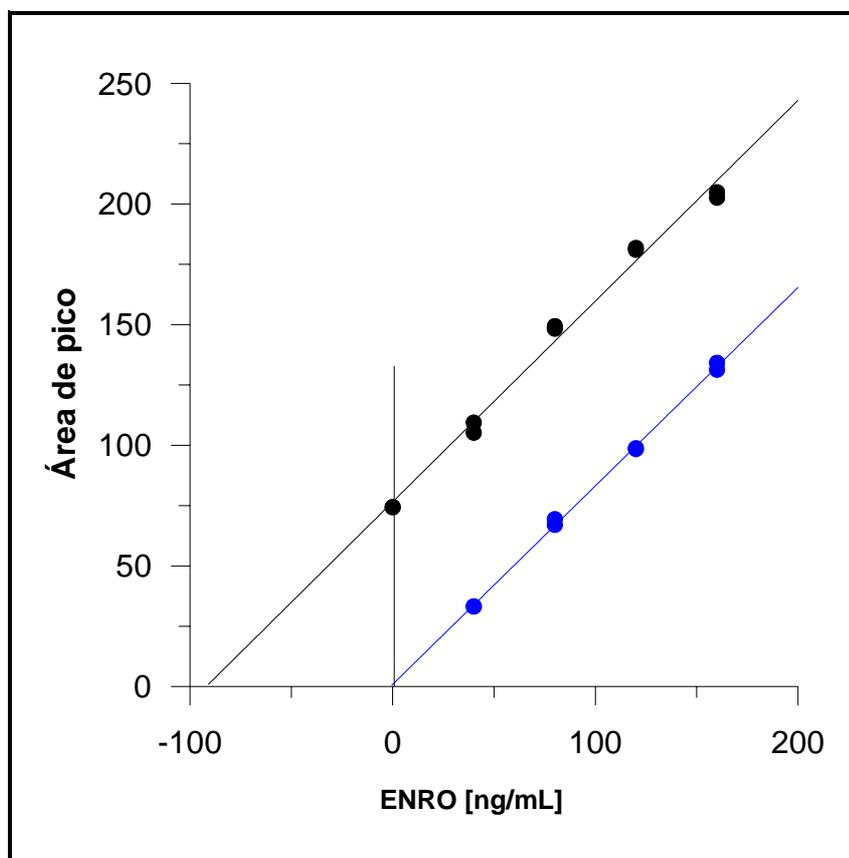


Figura VII. 11.- Recta de calibrado de patrón externo y de adición patrón en orina para ENRO ($\lambda_{exc.} = 277 \text{ nm}$; $\lambda_{em.} = 444 \text{ nm}$).

Para comparar las pendientes de la recta de calibrado patrón y de la recta de adición patrón, se llevó a cabo el estudio de validación mediante el test de Fisher para la varianza (F) y el test de Student para comparación de valores de ambas pendientes. Estos cálculos se hicieron mediante el empleo del software ACOC (apéndice I de esta Memoria). Utilizando un nivel de probabilidad del 95 %, existen diferencias significativas entre las varianzas ($F_{cal} = 11.85$ y $F_{Tab} = 3.29$), siendo las pendientes estadísticamente indistinguibles para ambas rectas. ($t_{cal} = 0.302$ y $t_{tab} = 2.33$). En la tabla VII. 10 se resumen los parámetros estadísticos asociados con ambas rectas

Tabla VII. 10.- Rectas de calibrado del patrón externo y adición patrón en orina para ENRO.

RECTA DE ADICIÓN PATRÓN	RECTA DEL PATRÓN EXTERNO
$\text{Área pico}^* = 0.8323 [\text{ENRO}] + 76.55$ $\sigma_{\text{pendiente}} = 0.03$ $\sigma_{\text{ordenada}} = 2.88$ $\sigma_{\text{estimada}} = 5.26$ $r = 0.995$	$\text{Área pico} = 0.8226 [\text{ENRO}] + 0.9250$ $\sigma_{\text{pendiente}} = 0.01$ $\sigma_{\text{ordenada}} = 1.35$ $\sigma_{\text{estimada}} = 1.55$ $r = 0.999$
$[\text{ENRO}]_{\text{calculado}} = 92 \text{ ng/mL (R= 92 \%)}$	

*Área de pico expresada como $\text{mV} \cdot \text{s}$

Del valor de ordenada obtenido se calcula una concentración adicionada en la orina original de $46 \mu\text{g mL}^{-1}$, por adición patrón, y $45 \mu\text{g mL}^{-1}$ cuando se analiza por patrón externo, que con respecto a los $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ adicionados corresponde a un 92% y 90 % de recuperación, respectivamente.

Para verificar las recuperaciones obtenidas en la metodología de la adición patrón se realizó el correspondiente test de la elipse¹¹. En este test se realiza la regresión pseudo univariante entre la concentración adicionada y las concentraciones predichas en los patrones de adición patrón. Si EJCR para la verdadera pendiente y la ordenada de la regresión anterior comprende al punto ideal [1, 0], los valores de recuperación calculados para la adición patrón se puede considerar como adecuados y, por tanto, se puede establecer la ausencia de efecto de matriz.

¹¹ González, A.G.; Herrador, M.A.; Asuero, A.G.; *Talanta*, 48, 729, 1999

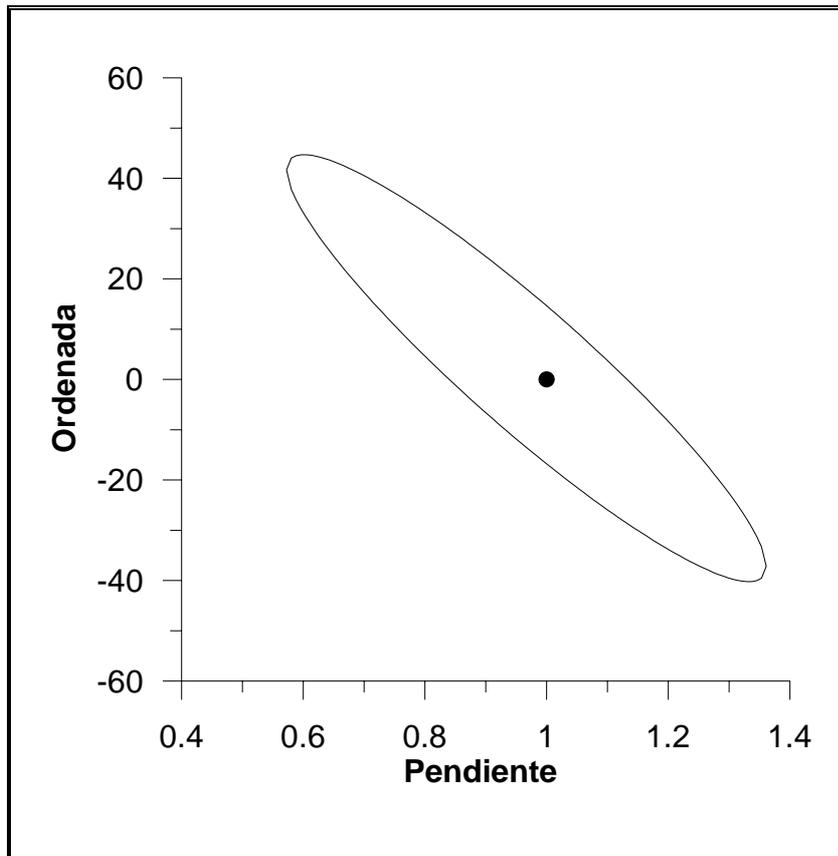


Figura VII. 12.- EJCR para ENRO empleando la recta de adición patrón y la del patrón externo.

Como podemos observar en la siguiente figura anterior, el punto ideal de pendiente 1 y ordenada 0 está perfectamente comprendido en la región de confianza elíptica. Por lo tanto, se puede asumir que la matriz no presenta efecto significativo.

b) Norfloxacin

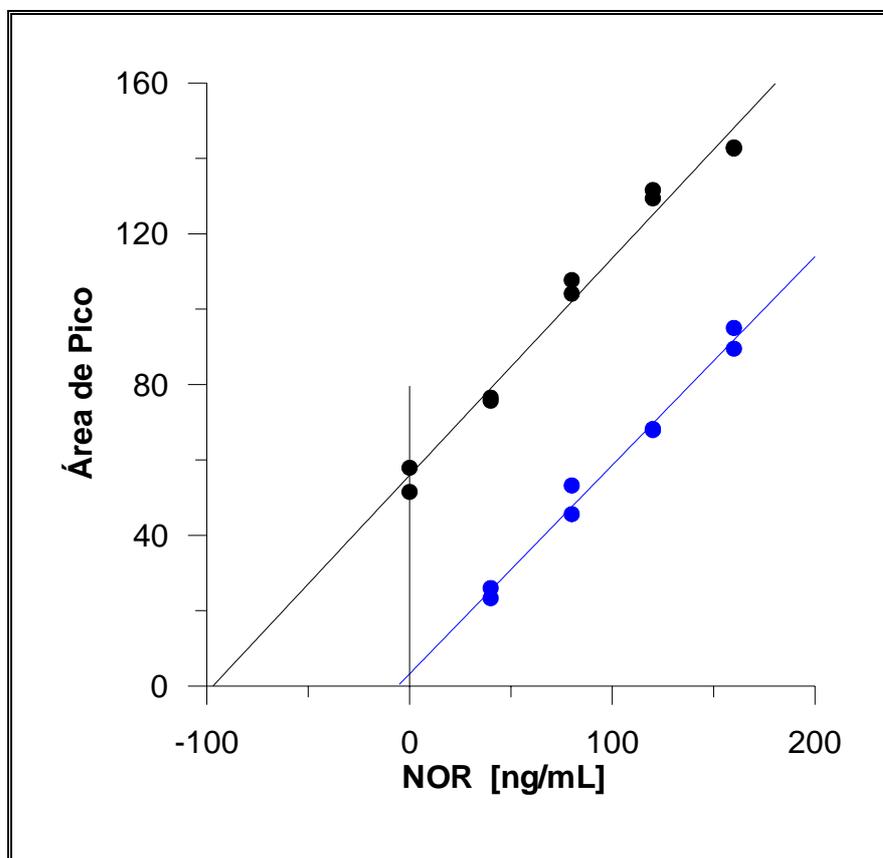


Figura VII. 13.- Recta de calibrado y adición de patrón de en orina para NOR ($\lambda_{exc} = 277\text{nm}$; $\lambda_{em} = 444\text{nm}$).

Siguiendo una sistemática similar a la descrita para el ENRO, se llevó a cabo el estudio comparativo entre las pendientes por ambas metodologías. Utilizando un nivel de probabilidad del 95 %, no existen diferencias significativas entre las pendientes de ambas rectas ($t_{cal} = 0.380$ y $t_{tab} = 2.60$). Podemos concluir, por tanto, que no existe efecto matriz en la determinación de NOR debido a la orina presente.

Tabla VII. 11.- Rectas de calibrado del patrón externo y adición patrón en orina de NOR.

RECTA DE ADICIÓN PATRÓN	RECTA DEL PATRÓN EXTERNO
$\text{Área pico} = 0.5523 [\text{NOR}] + 56.81$ $\sigma_{\text{pendiente}} = 0.03$ $\sigma_{\text{ordenada}} = 2.66$ $\sigma_{\text{estimada}} = 3.96$ $r = 0.995$	$\text{Área pico} = 0.5419 [\text{NOR}] + 2.836$ $\sigma_{\text{pendiente}} = 0.01$ $\sigma_{\text{ordenada}} = 0.97$ $\sigma_{\text{estimada}} = 1.02$ $r = 0.999$
$[\text{NOR}]_{\text{calculada}} = 103 \text{ ng/mL (R= 103 \%)}$	

Mediante la adición patrón se calcula en la orina original una concentración de $51.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ y mediante el patrón externo de $51.0 \mu\text{g mL}^{-1}$, lo cual, con respecto a la cantidad adicionada originalmente a la orina, arroja unos valores de 103 y 102 % de recuperación, respectivamente. Podemos asegurar, por tanto, que no se produce efecto matriz apreciable debido a la orina.

Para verificar las recuperaciones obtenidas para el resto de puntos de la recta de adición patrón, comparándola con la del patrón externo, se realizó el correspondiente test de la elipse¹¹. Como podemos observar en la figura VII.14, el punto ideal de pendiente 1 y ordenada 0, queda centrado en la región de confianza elíptica.

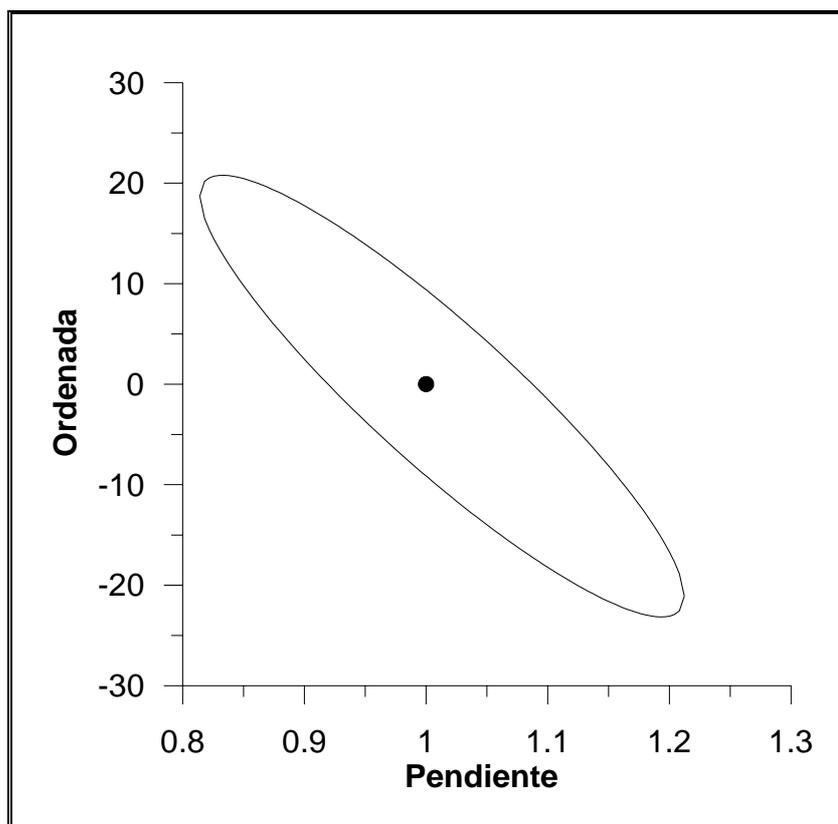


Figura VII. 14.- EJCR para el NOR empleando la recta de adición patrón y la del patrón externo

c) Ofloxacino

En la figura VII.15 podemos observar las rectas obtenidas para OFLO mediante ambas metodologías, patrón externo y adición patrón.

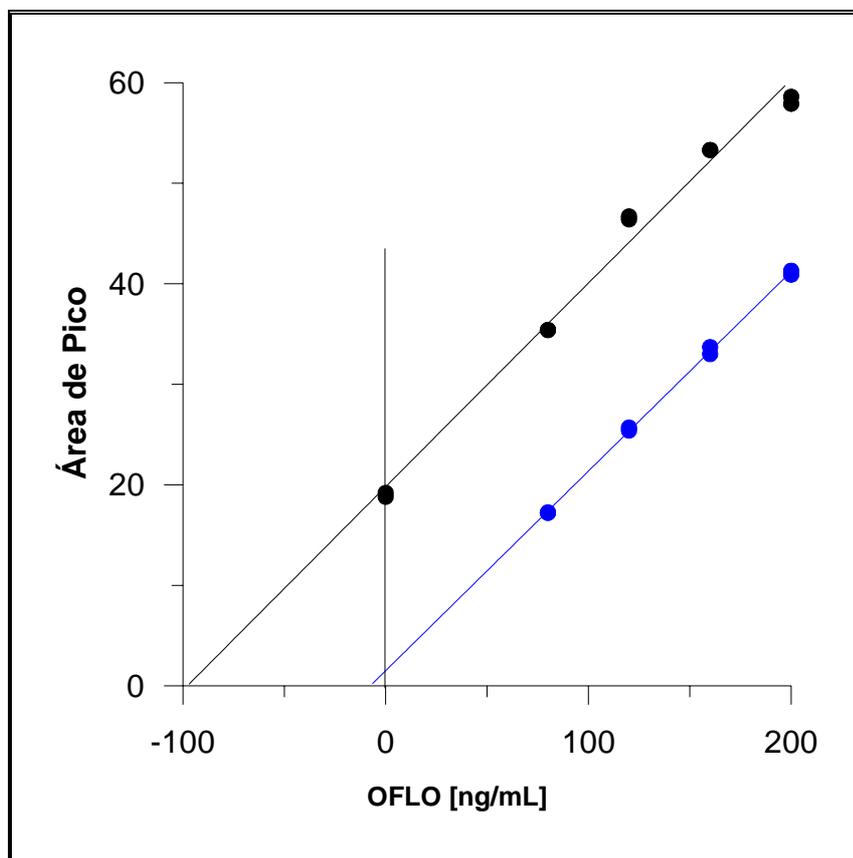


Figura VII. 15.- Recta de calibrado y adición patrón en orina para OFLO ($\lambda_{exc} = 277nm$; $\lambda_{em} = 490nm$).

Utilizando un nivel de probabilidad del 95 %, se comprobó que no existen diferencias significativas entre las pendientes de ambas rectas. ($t_{cal} = 0.471$ y $t_{tab} = 2.32$).

En la Tabla VII. 12 se han resumido los parámetros estadísticos asociados con ambas rectas.

Tabla VII. 12.- Rectas de calibrado del patrón externo y adición patrón en orina para OFLO.

RECTA DE ADICIÓN PATRÓN	RECTA DEL PATRÓN EXTERNO
$\text{Área pico} = 0.2025 \cdot [\text{Oflo}] + 19.816$ $\sigma_{\text{pendiente}} = 0.01$ $\sigma_{\text{ordenada}} = 1.07$ $\sigma_{\text{estimada}} = 1.77$ $r = 0.994$	$\text{Área pico} = 0.1985 \cdot [\text{Oflo}] + 1.514$ $\sigma_{\text{pendiente}} = 0.002$ $\sigma_{\text{ordenada}} = 0.35$ $\sigma_{\text{estimada}} = 0.30$ $r = 1.000$
$[\text{Oflo}]_{\text{calculada}} = 98 \text{ ng/mL (R= 98 \%)}$	

La determinación mediante adición patrón permite calcular un valor de $49 \mu\text{g mL}^{-1}$ en la orina original y, mediante el patrón externo, $45 \mu\text{g mL}^{-1}$, que corresponden a un 98 y 90 % de recuperación, respectivamente.

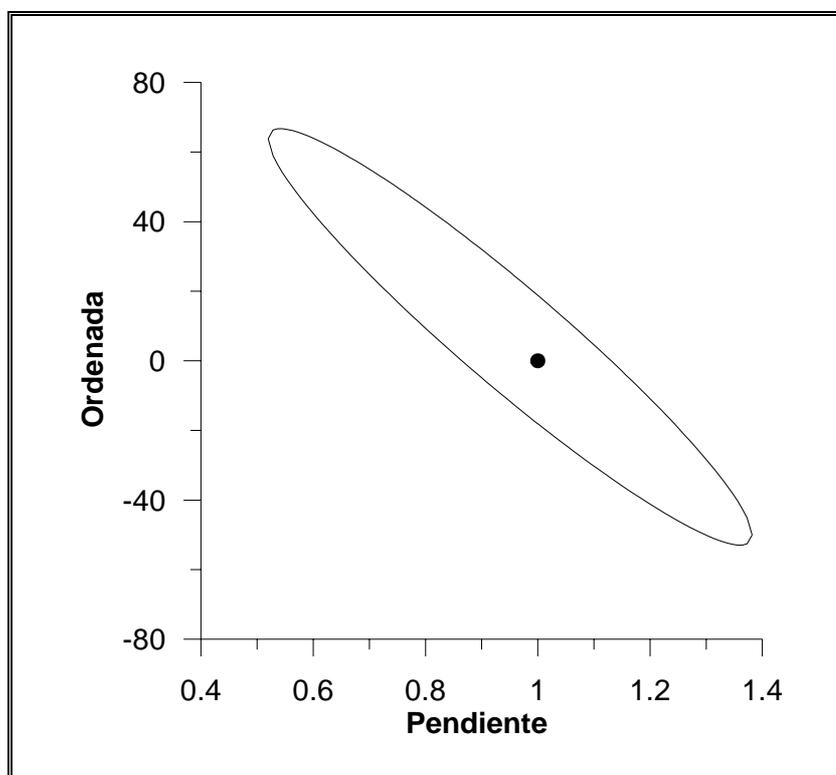


Figura VII. 16.- EJCR para OFLO empleando la recta de adición patrón y patrón externo.

Podemos observar la inclusión del punto teórico [0,1] dentro del intervalo de confianza de la elipse y queda demostrado la no significancia del efecto matriz.

d) Enoxacino

Con respecto al enoxacino, hay que destacar que debido a su baja sensibilidad, no se alcanzaría el nivel de cuantificación, sobre muestras de orina para la misma dilución que la empleada en los casos anteriores. En cualquier caso, se ha determinado el efecto de la presencia de orina en las muestras de calibración como podemos observar en la Figura VII. 17, concluyendo que no existen prácticamente diferencias entre ambas curvas.

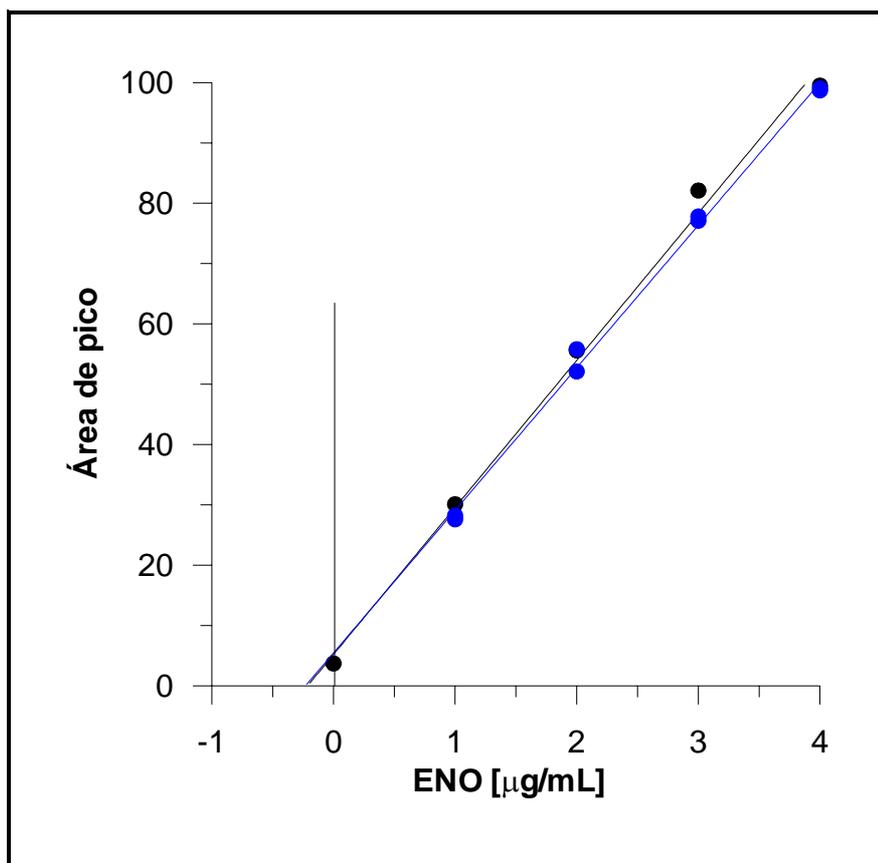


Figura VII. 17.- Rectas de adición patrón en orina y del patrón externo para el ENO ($\lambda_{exc} = 277nm$; $\lambda_{em} = 407nm$).

Esto indica que la determinación en principio se podría llevar a cabo, pero como hemos indicado anteriormente sería necesario hacer una menor dilución.

Como creemos que no tiene interés realizar dos diluciones distintas para una misma muestra de orina, no proponemos la determinación de ENO en presencia de las otras tres fluoroquinolonas mediante este procedimiento en orina. En estudios posteriores se abordará la viabilidad de metodologías que incrementen la sensibilidad para el ENO y permitan su determinación en presencia de otras fluoroquinolonas en una única muestra de orina.

La metodología propuesta permite por tanto la determinación de OFLO, ENRO y NOR en muestras de orina.

4. Determinación de ENO, OFLO, ENRO y NOR en suero plasmático empleando la metodología propuesta.

La presencia de estas quinolonas en suero plasmático hace que sea de interés el establecimiento de una metodología para su determinación de forma simultánea.

De acuerdo con la bibliografía, las concentraciones de estas quinolonas en suero plasmático oscilan entre 0 -5 $\mu\text{g/mL}$ ¹².

El método operativo seguido fue el siguiente: sueros procedentes de individuos sanos fueron contaminados convenientemente con las fluoroquinolonas objeto de estudio, de manera que las concentraciones de éstas en el suero inicial fueran de 1.0 $\mu\text{g/mL}$. Posteriormente, se realiza una dilución al suero de 10 veces, por tanto, la concentración de los principios activos en las disoluciones finales inyectadas en el sistema fue de 100 ng/mL.

Se prepararon muestras de suero, procedentes de individuos no tratados con estos antibióticos y se contaminaron de forma apropiada con ENO, OFLO, ENRO y NOR, tal como se ha indicado. Se toma 1.00 mL y se lleva a un matraz de 10 mL donde se enrasa con tampón fosfato (30.0 mM, pH=3.05).

Se prepararon un conjunto de cuatro patrones, conteniendo este suero contaminado, y se inyectaron por duplicado, previo filtrado, como se indicó en el procedimiento anterior. De forma paralela se inyectaron patrones en ausencia de suero, con objeto de comparar ambas experiencias.

En la Figura VII. 18 se muestra el cromatograma obtenido para una muestra de suero contaminado con los analitos en estudio. Se observa un primer pico correspondiente al fondo de suero, a continuación, cuatro picos perfectamente definidos de las fluoroquinolonas y un sexto pico también del suero.

¹² Knapp, J.S.; Fox, K.K.; Tres, D.L.; Whittington, W.L.; *Emergency Infection Disease*,3,33,1997

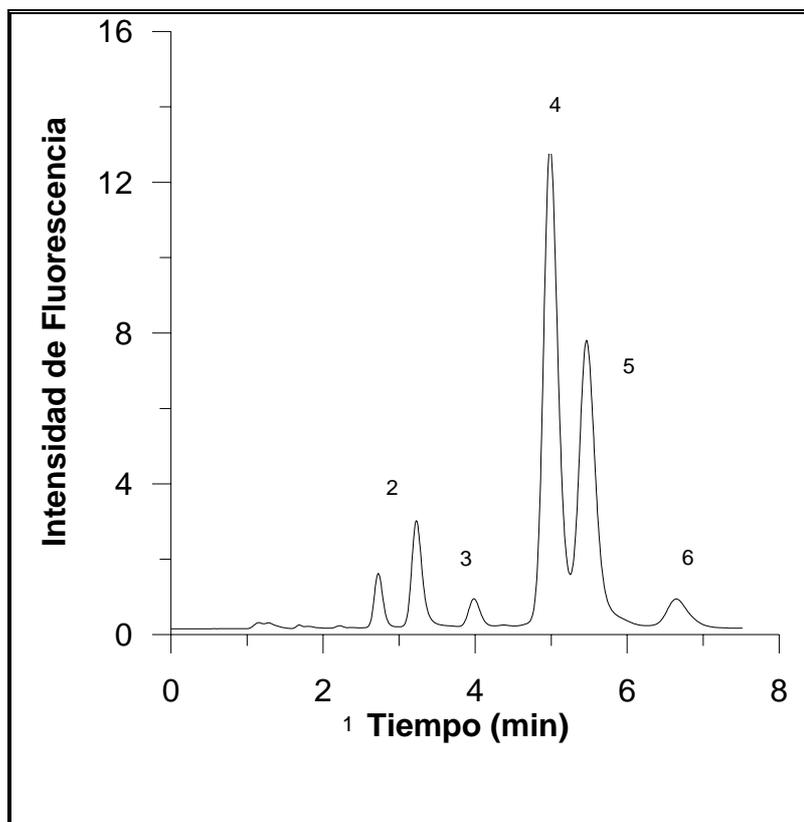


Figura VII. 18.- Cromatograma de una muestra de suero contaminada con ENO (2), OFLO (3), ENRO (4) y NOR(5). Los picos 1 y 6 corresponden al suero.

Se calcularon las rectas de adición patrón y de patrón externo para cada analito, estableciéndose los parámetros estadísticos de comparación así como de recuperación

a) Enrofloxacinó

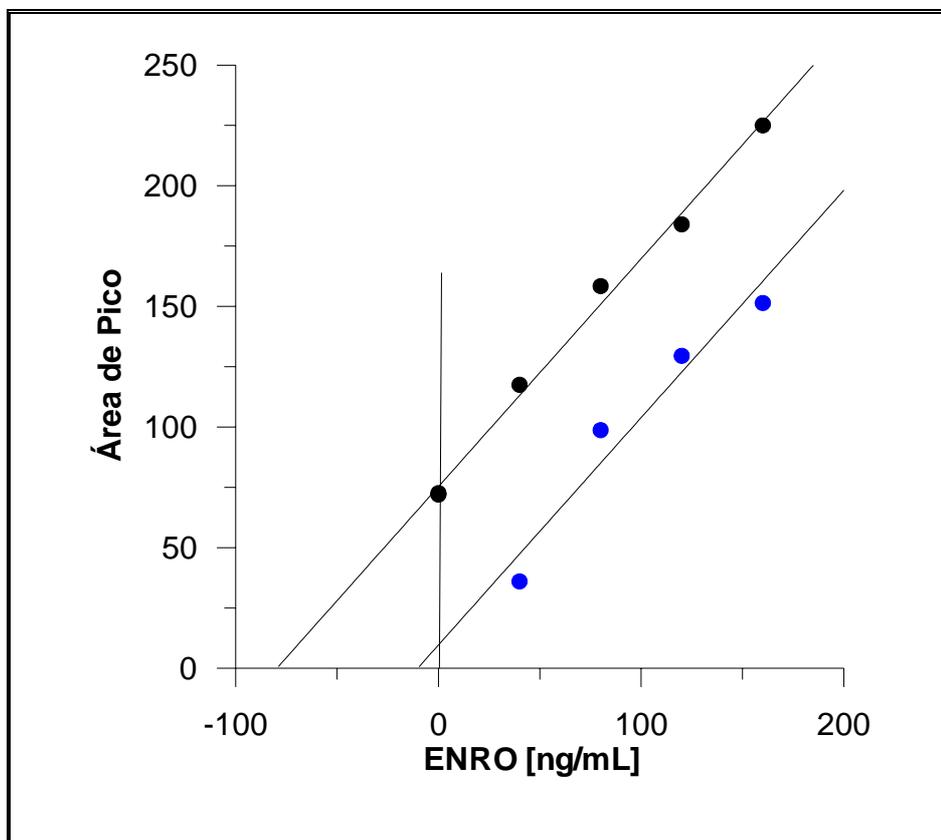


Figura VII. 19.- Recta de calibrado y de adición de patrón en suero para ENRO ($\lambda_{exc} = 277\text{nm}$; $\lambda_{em} = 444\text{nm}$).

Utilizando un nivel de probabilidad del 95 %, se comprobó que no existen diferencias significativas entre las pendientes de ambas rectas. ($t_{cal} = 0.017$ y $t_{tab} = 2.44$).

Tabla VII. 13.- Rectas de calibrado del patrón externo y adición patrón para ENRO en suero.

RECTA DE ADICIÓN PATRÓN	RECTA DEL PATRÓN EXTERNO
$\text{Área pico} = 0.9446 [\text{ENRO}] + 75.27$ $\sigma_{\text{pendiente}} = 0.04$ $\sigma_{\text{ordenada}} = 3.37$ $\sigma_{\text{estimada}} = 3.33$ $r = 0.997$	$\text{Área pico} = 0.9425[\text{ENRO}] + 9.65$ $\sigma_{\text{pendiente}} = 0.166$ $\sigma_{\text{ordenada}} = 1.82$ $\sigma_{\text{estimada}} = 1.48$ $r = 0.970$
$[\text{ENRO}]_{\text{calculada}} = 84 \text{ ng/mL (R= 84 \%)}$	

Se calcularon valores de 84 ng/mL por adición patrón, valor bajo pero comparable a los obtenidos con otras metodologías. Por el patrón externo fueron de 94 ng/mL.

b) Norfloxacinó

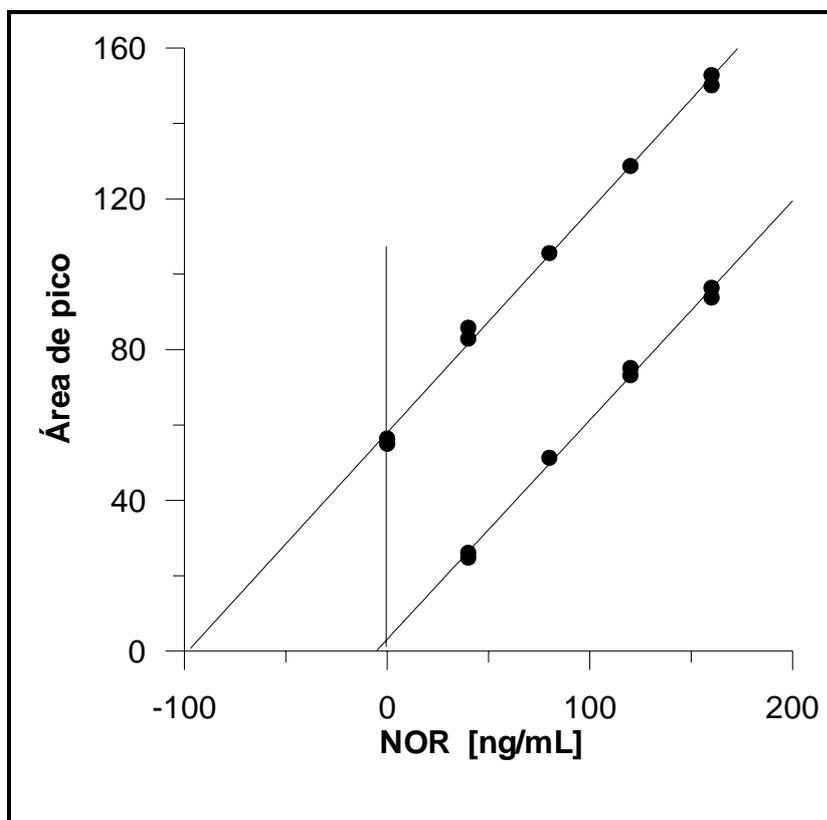


Figura VII. 20.- Recta de calibrado y adición de patrón en suero de NOR ($\lambda_{exc} = 277\text{nm}$; $\lambda_{em} = 444\text{nm}$).

Para comparar que las pendientes de la recta de calibrado patrón y de la recta de adición patrón no son significativamente diferentes, se llevó a cabo el estudio de validación mediante el test de comparación anteriormente descrito. Utilizando un nivel de probabilidad del 95 %, no existen diferencias significativas entre las pendientes de ambas rectas ($t_{cal} = 0.375$ y $t_{tab} = 2.20$). No existe, por tanto, efecto de matriz en la determinación.

Los valores de NOR en el suero calculados fueron 0.98 µg/mL y 1.00 µg/mL, mediante la adición patrón y el patrón externo, respectivamente, es decir un 98 y 100 % de recuperación por las metodologías ensayadas. Estos valores son muy satisfactorios (Tabla VII.14)

Tabla VII. 14.- Rectas de calibrado del patrón externo y adición patrón para NOR.

RECTA DE ADICIÓN PATRÓN	RECTA DEL PATRÓN EXTERNO
$\text{Área pico} = 0.5896 [\text{NOR}] + 57.94$ $\sigma_{\text{pendiente}} = 0.01$ $\sigma_{\text{ordenada}} = 1.37$ $\sigma_{\text{estimada}} = 2.46$ $r = 0.998$	$\text{Área pico} = 0.5815 [\text{NOR}] + 3.1412$ $\sigma_{\text{pendiente}} = 0.01$ $\sigma_{\text{ordenada}} = 1.67$ $\sigma_{\text{estimada}} = 1.78$ $r = 0.999$
$[\text{NOR}]_{\text{calculada}} = 98 \text{ ng/mL (R= 98 \%)}$	

Se calcularon valores de 98 ng/mL y de 100 ng/mL por adición patrón y por el patrón externo, respectivamente.

c) Ofloxacino

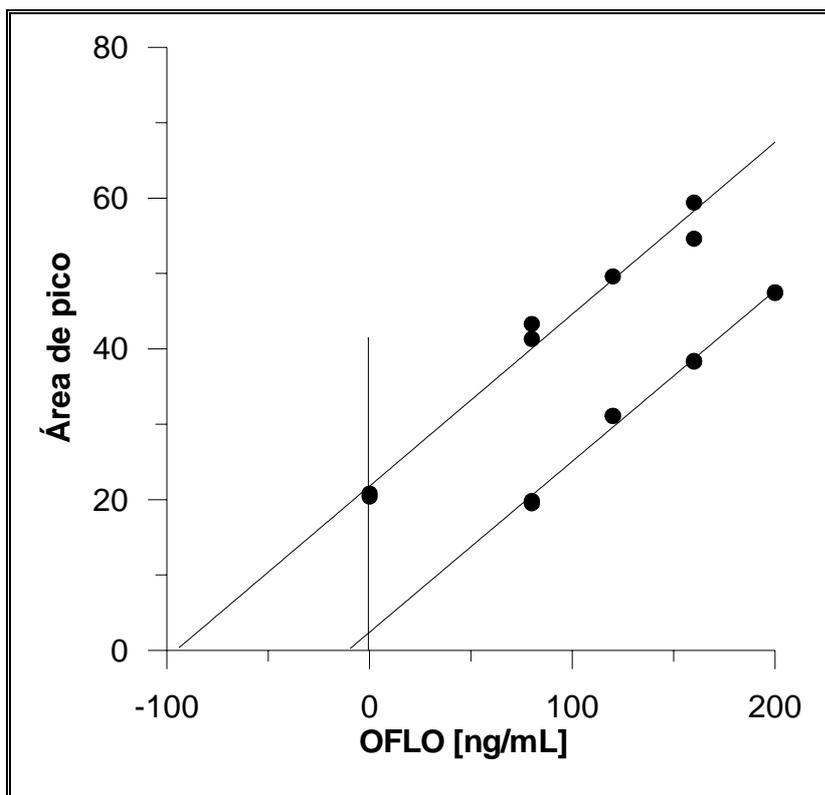


Figura VII. 21.- Recta de calibrado y de adición de patrón en suero de OFLO ($\lambda_{exc} = 277\text{nm}$; $\lambda_{em} = 490\text{nm}$).

Se comprobó que no existen diferencias significativas entre las pendientes de ambas rectas. ($t_{cal} = 0.091$ y $t_{tab} = 2.54$).

Tabla VII. 15.- Rectas de calibrado del patrón externo y adición patrón en suero de OFLO.

RECTA DE ADICIÓN PATRÓN	RECTA DEL PATRÓN EXTERNO
Área pico = 0.2282 [OFLO] + 21.78	Área pico = 0.2266 [OFLO] + 2.410
$\sigma_{pendiente} = 0.01$	$\sigma_{pendiente} = 0.008$
$\sigma_{ordenada} = 1.58$	$\sigma_{ordenada} = 1.20$
$\sigma_{estimada} = 2.45$	$\sigma_{estimada} = 1.04$
$r = 0.989$	$r = 0.996$
[OFLO] calculada = 95 ng/mL (R= 95 %)	

Se calcularon valores de 95 ng/mL por adición patrón y de 81 ng/mL por el patrón externo.

d) Enoxacino

Con respecto al enoxacino, tenemos el mismo problema que el descrito con la orina. La señal producida por el analito no alcanza el nivel de cuantificación, quedando las rectas del patrón externo y de adición patrón completamente solapadas para el nivel de concentraciones añadido a las muestras de suero (Figura VII. 22).

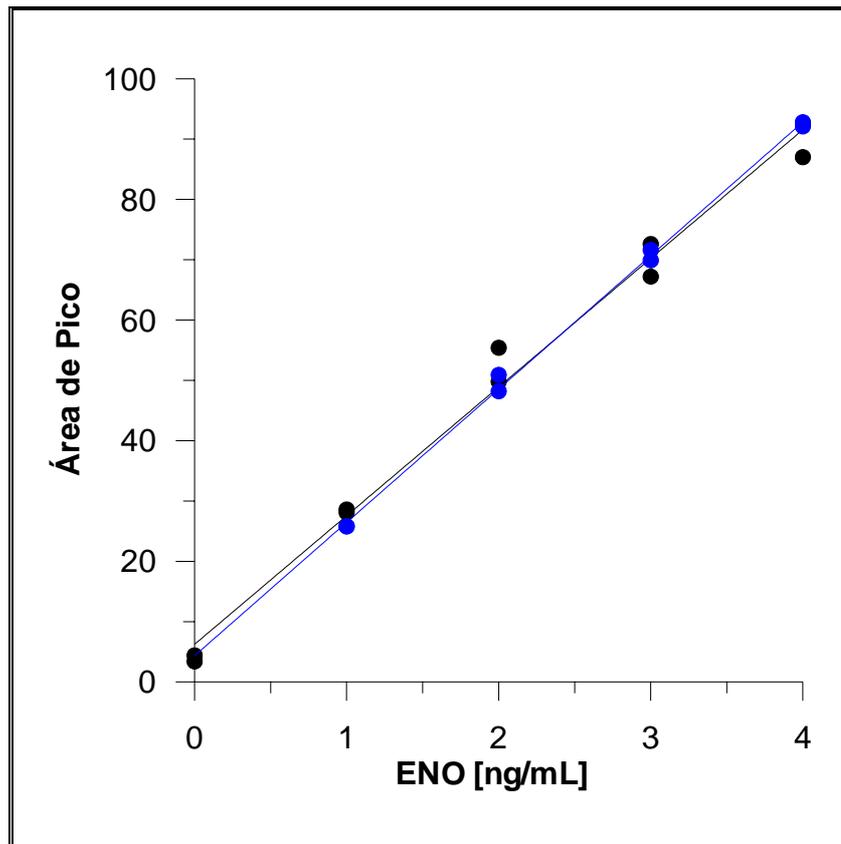


Figura VII. 22.- Recta de calibrado y de adición de patrón para el ENO en suero ($\lambda_{exc} = 277\text{nm}$; $\lambda_{em} = 407\text{nm}$).

Se observa como ambas pendientes son similares pero no se aborda la validación del método dada la limitada sensibilidad para ENO.

Por último, un análisis conjunto de la varianza para la ordenada y la pendiente de la regresión encontrado puesto (Figura VII.23), pone de manifiesto la no existencia de efecto matriz significativo en todos los casos.

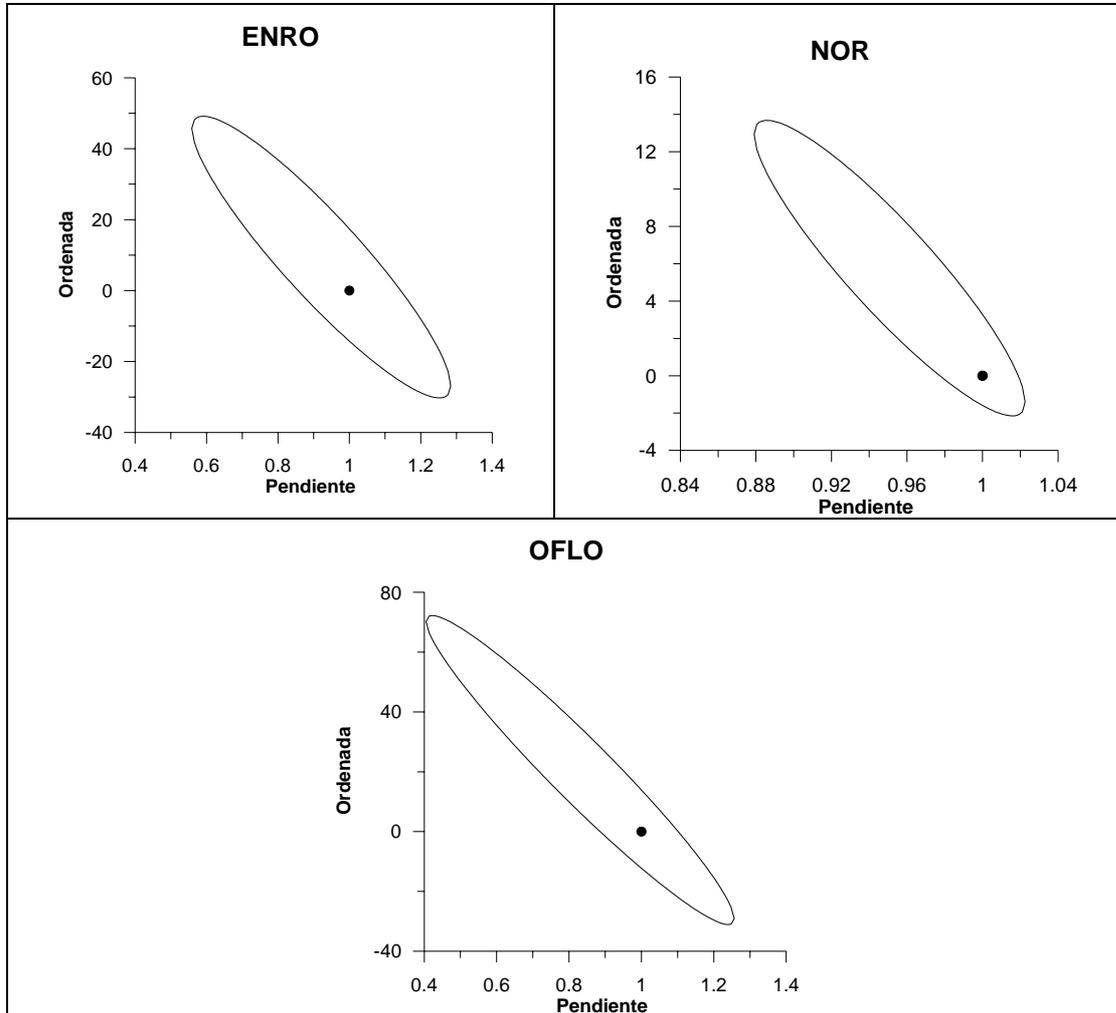


Figura VII. 23.- Test de las elipses para adiciones patrón en suero.

Como se puede observar en la figura VII.23 la mayor desviación se obtiene para NOR y los mejores resultados para ENRO.

5. Efectos de la irradiación externa

Con objeto de incrementar la sensibilidad en el análisis y, fundamentalmente, debido a la necesidad de analizar ENO, e intentar la separación de las cinco fluoroquinolonas objeto de estudio, se realizaron estudios empleando un paso previo de irradiación, empleando una fuente U.V. de alta potencia.

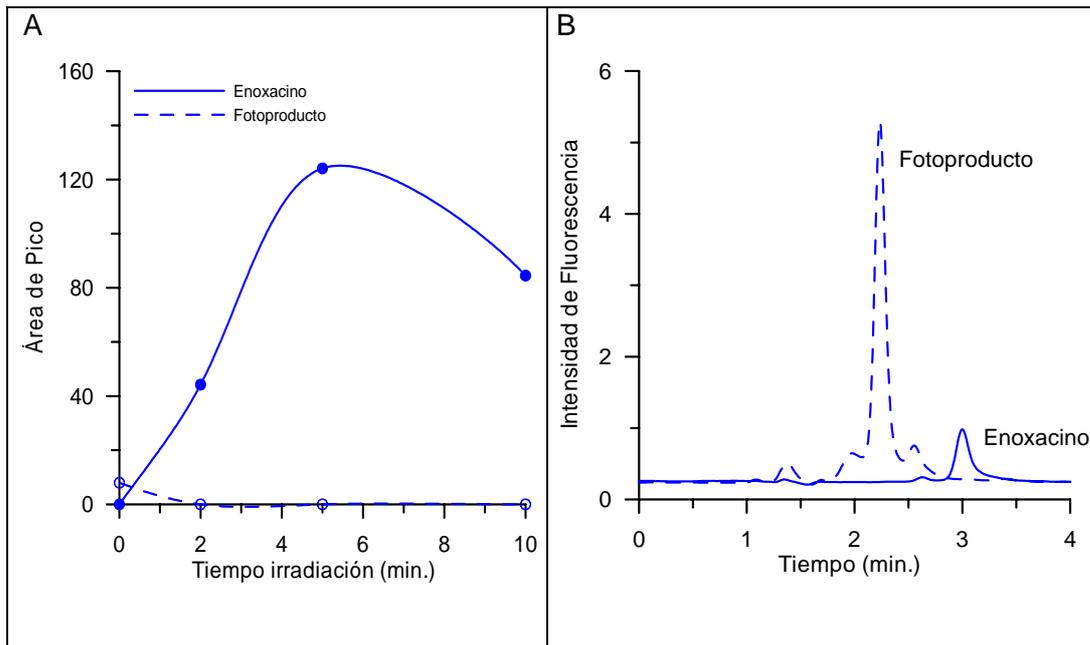
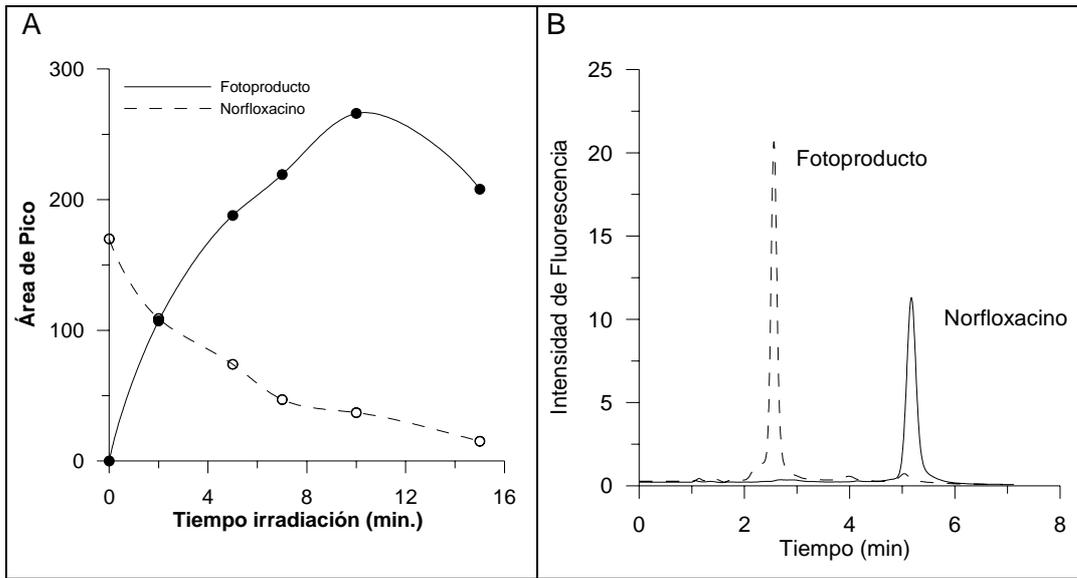
En base a los estudios previos (capítulo V), en los que se ponía de manifiesto el incremento en la fluorescencia de diversas fluoroquinolonas cuando eran irradiadas en medio etanol-agua, se comenzó a estudiar el proceso de separación. Así, el siguiente paso es la separación cromatográfica de estos principios activos. Consideramos conveniente generar la muestra en condiciones químicas similares a las de la fase móvil, por lo que, una vez irradiadas en el medio hidroalcohólico, se diluye la muestra al doble en la fase móvil empleada.

Optimización del tiempo de irradiación

Se procedió a establecer las condiciones de irradiación óptimas realizando un seguimiento cromatográfico del proceso en las condiciones establecidas previamente. Para ello, se inyectaron de forma individual las fluoroquinolonas de partida, previamente a su irradiación y una vez irradiadas, durante diversos periodos de tiempo (Figura VII. 24).

En las Figuras VII.24.A se representa el efecto del tiempo de irradiación sobre el área de pico correspondiente a la fluoroquinolona de partida y de los fotoproductos formados.

En las Figuras VII.24.B se representa el cromatograma de la fluoroquinolona de partida y de los fotoproductos generados.



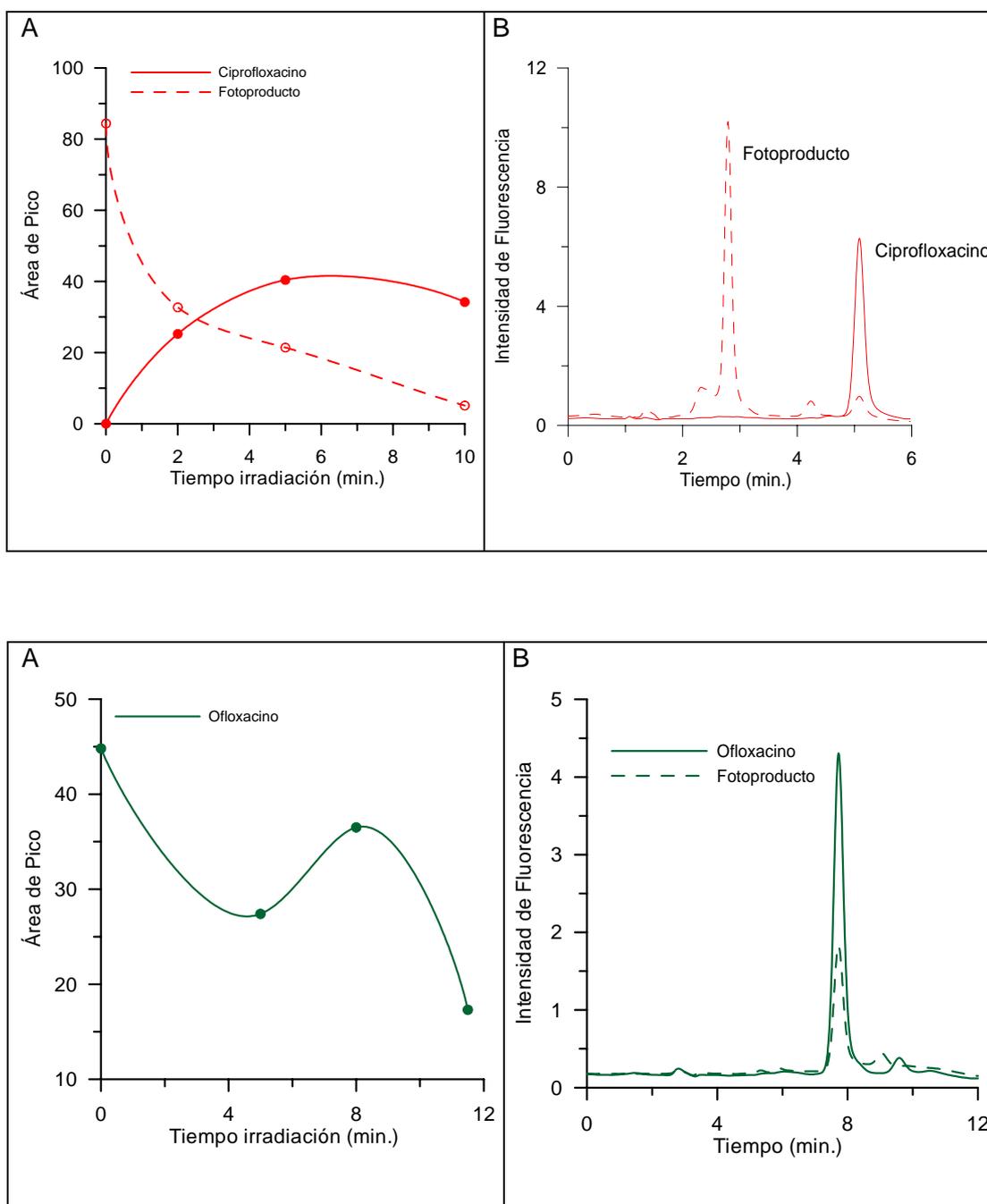


Figura VII. 24.- A) Efecto del tiempo de irradiación sobre el area de pico correspondiente a la fluoroquinolona de partida y de los fotoproductos formados. B) Cromatograma de las fluoroquinolonas de partida y de los fotoproductos generados.

En la figura VII. 24, podemos observar que para NOR, ENO y CIPRO se observa la aparición de picos a tiempos cortos, correspondientes a los fotoproductos, diferenciados del pico de las fluoroquinolonas de partida. Sin embargo, para el OFLO no aparece ningún pico nuevo durante el tiempo de registro. Por otra parte, se produce un incremento en el área de pico de los fotoproductos a medida que el tiempo de irradiación se incrementa, y una notable disminución del de la fluoroquinolona de partida. También se observa que el ENRO al ser irradiado, genera diversos picos, y por tanto, diversos fotoproductos, lo que dificulta su determinación. De hecho, en la bibliografía encontramos que el principal metabolito del ENRO es el CIPRO. Es por esto por lo que decidimos no incluirlo dentro de estos estudios.

Con respecto al tiempo de irradiación se establece como óptimo el de diez minutos; y lo hacemos en base al comportamiento del NOR, que parece que en el rango de concentraciones en el que estamos estudiando, requiere mayor tiempo para completar la fotoreacción.

Separación cromatográfica previa irradiación.

En base a los resultados anteriores se ensayaron diversas fases móviles conteniendo tampón fosfatos de forma semejante al procedimiento anterior y THF como modificador. El resultado de estos estudios nos indica que cuando se emplea una fase móvil compuesta por un 96 % de tampón fosfatos y un 4 % de THF, empleando un flujo de 1 mL/min se obtienen buenos resultados. A modo de ejemplo, en la Figura VII. 25 se muestra un cromatograma obtenido para la mezcla conteniendo ENO, NOR, CIPRO y OFLO previamente irradiado.

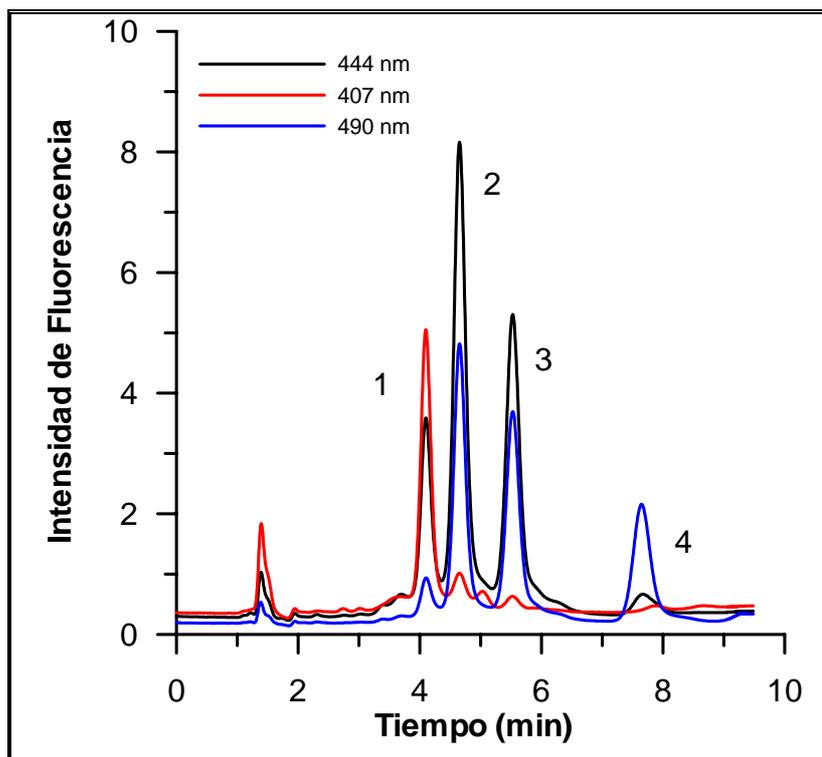


Figura VII. 25.- Cromatograma para los fotoproductos en las condiciones experimentales establecidas (1 : ENO*; 2: NOR*; 3:CIPRO* y 4: OFLO)

Las longitudes de onda de emisión más adecuadas para cada uno de ellos parecen ser 407 nm para ENO, 444 para NOR y CIPRO, y 490 nm para OFLO.

Estabilidad de los fotoproductos.

En orden a establecer el tiempo durante el cual los fotoproductos permanecen estables una vez generados, se preparó una disolución conteniendo inicialmente ENO (800 ng/mL), NOR (600 ng/mL), CIPRO (400 ng/mL) y OFLO (800 ng/mL). En las condiciones experimentales fijadas se irradió. Una vez irradiadas se diluyó al doble con tampón fosfato 30 mM (pH 3.05). A continuación se realizaron sucesivas inyecciones de las muestras irradiadas durante 3 horas y se observó que los fotoproductos, así como el OFLO, son estables al menos durante 3 horas.

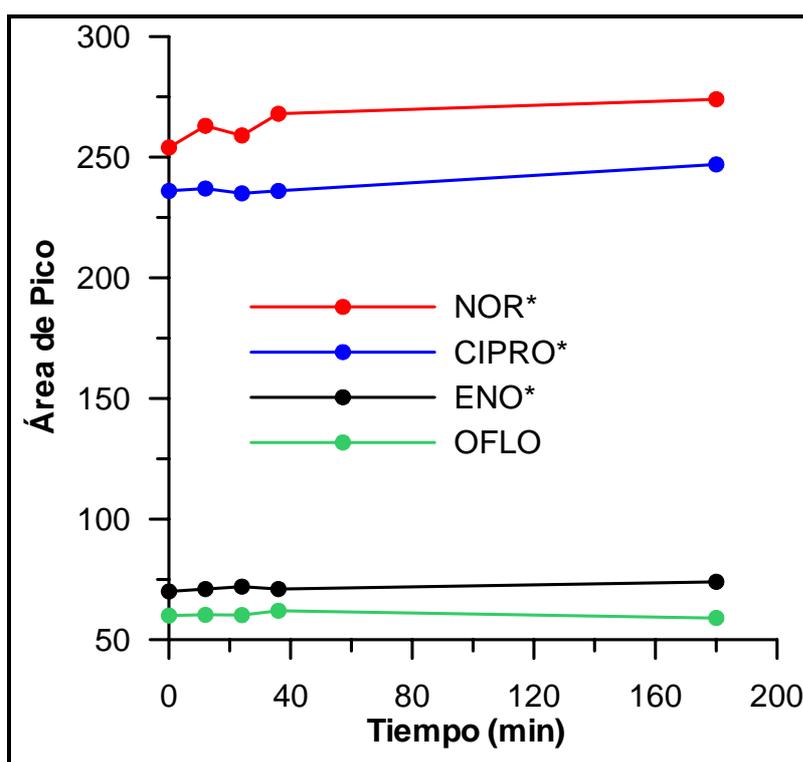


Figura VII. 26.- Estabilidad de los fotoproductos.

Linealidad

Se estudió el intervalo de concentraciones, para el cual estos analitos presentan una relación lineal entre la concentración y el área de pico obtenida para la separación de los fotoproductos y del OFLO.

En las figuras VII.27 a VII.30 se representan las rectas de calibrado obtenidas por inyección de los patrones por triplicado. Los parámetros estadísticos correspondiente se resumen en las Tablas VII.16 a VII.19.

a) Enoxacino

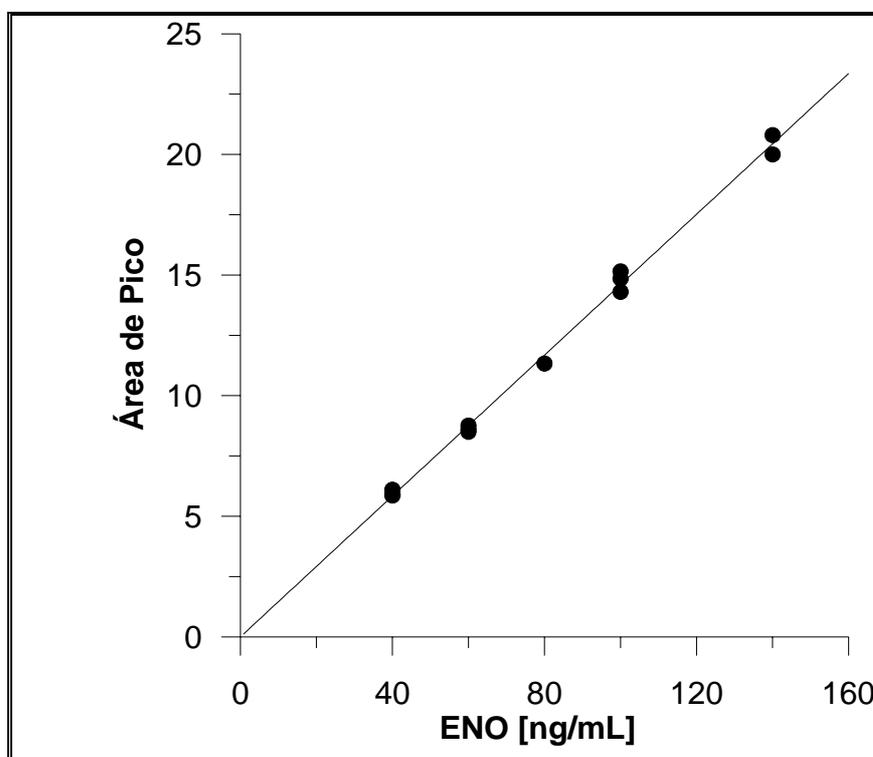


Figura VII. 27.- Recta de calibrado para la determinación de ENO previa irradiación ($\lambda_{ex}= 277\text{nm}$, $\lambda_{em}= 407\text{nm}$).

Tabla VII. 16.- Parámetros estadísticos de la calibración de ENO.

	Enoxacino
Ordenada Origen (So)	0.001±0.237
Pendiente (UFmL/ng) (Sp)	0.146±0.003
Coef. Regresión	0.998
S (R,c)	0.326
Linealidad (%)	98.1
Límite de detección Clayton (ng/mL)	7.3
Límite de detección Winefordner y Long (k=3) (ng/mL)	4.9
Sensibilidad (ng/mL)*	2.2

* Expresada como γ^{-1}

b) Norfloxacinó

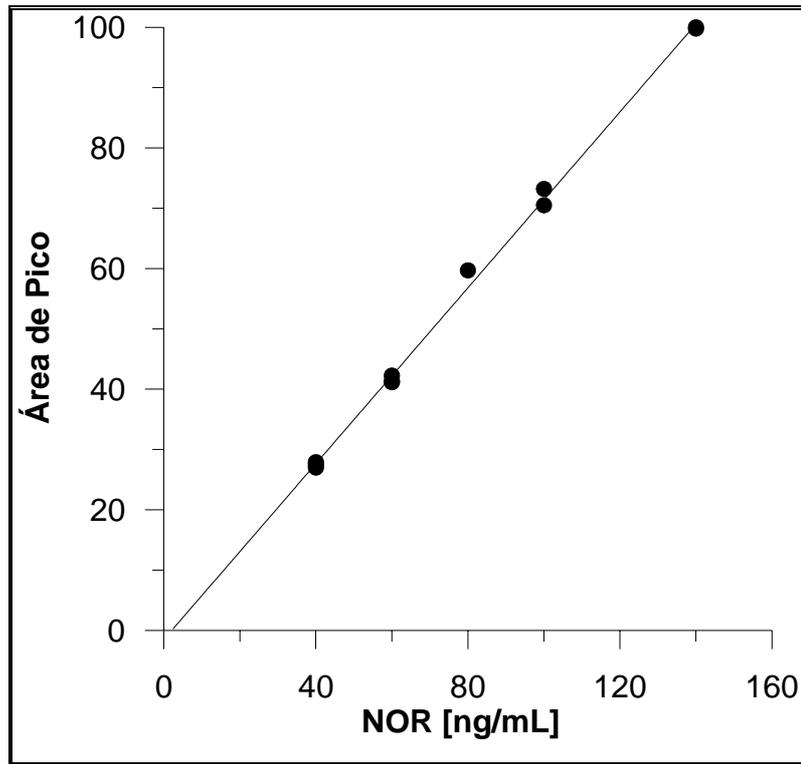


Figura VII. 28.- Recta de calibrado para la determinación de NOR previa irradiación ($\lambda_{ex}= 277nm$, $\lambda_{em}= 444nm$).

Tabla VII. 17. Parámetros estadísticos relacionados con la calibración de NOR previa irradiación.

	Norfloxacinó
Ordenada Origen (S_o)	-1.522±0.962
Pendiente (UFmL/ng) (S_p)	0.729±0.011
Coef. Regresión	0.999
S (R,c)	1.32
Linealidad (%)	98.5
Límite de detección Clayton (ng/mL)	6.0
Límite de detección Winefordner y Long (k=3) (ng/mL)	4.0
Sensibilidad (ng/mL)*	1.8

* Expresada como γ

1

c) Ciprofloxacino

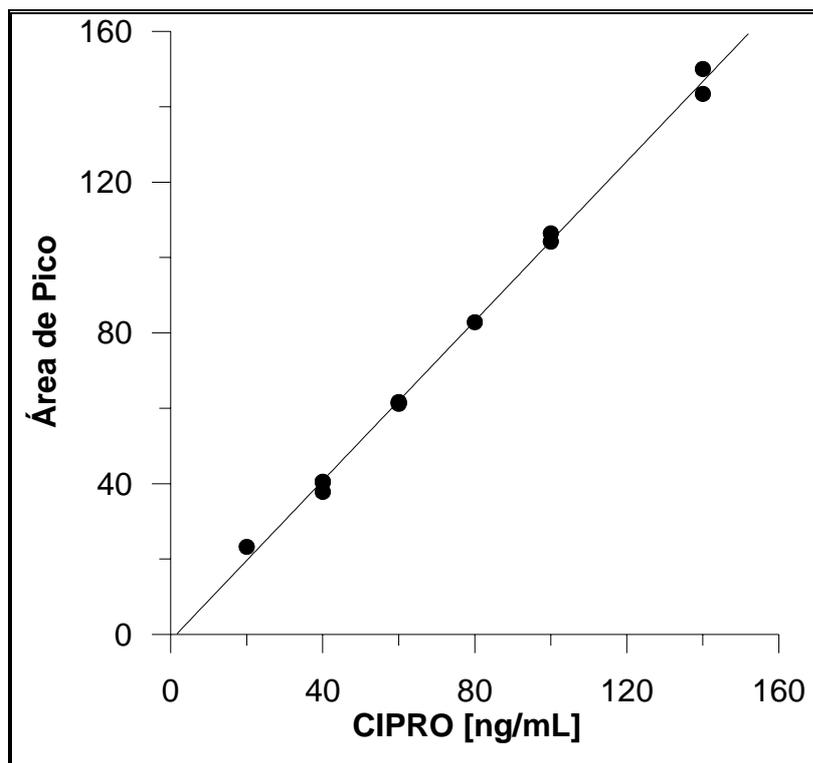


Figura VII. 29.- Calibración de CIPRO previa irradiación ($\lambda_{ex}= 277nm$, $\lambda_{em}= 444nm$).

Tabla VII. 18.- Parámetros estadísticos obtenidos para la calibración de CIPRO previa irradiación

	Ciprofloxacino
Ordenada Origen (So)	-1.579±1.401
Pendiente (UFmL/ng) (Sp)	1.059±0.017
Coef. Regresión	0.999
S (R,c)	2.22
Linealidad (%)	98.4
Límite de detección Clayton (ng/mL)	6.3
Límite de detección Winefordner y Long (k=3) (ng/mL)	4.0
Sensibilidad (ng/mL)*	2.1

* Expresada como γ^{-1}

d) Ofloxacino

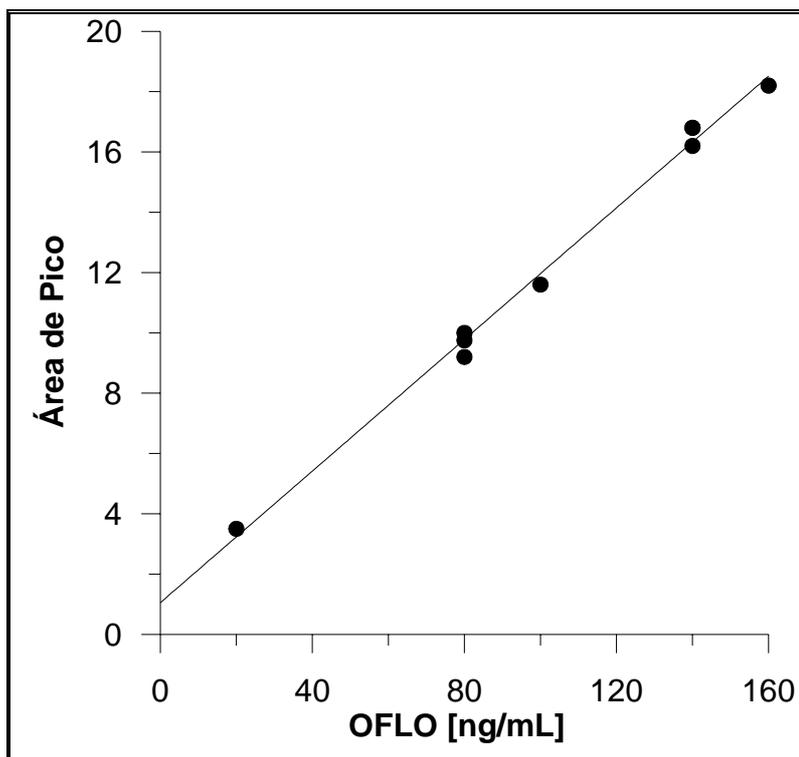


Figura VII. 30.- Calibración de OFLO previa irradiación ($\lambda_{ex} = 277\text{nm}$, $\lambda_{em} = 490\text{ nm}$).

Tabla VII. 19.- Parámetros estadísticos obtenidos para la calibración de OFLO previa irradiación

	Ofloxacino
Ordenada Origen (So)	1.05±0.362
Pendiente (UFmL/ng) (Sp)	0.109±0.003
Coef. Regresión	0.997
S (R,c)	0.40
Linealidad (%)	97
Límite de detección Clayton (ng/mL)	14.5
Límite de detección Winefordner y Long (k=3) (ng/mL)	10.0
Sensibilidad (ng/mL)*	3.7

* Expresada como γ^{-1}

Repetitividad del método

Se realizó el correspondiente estudio para determinar la repetitividad de la separación cromatográfica. Para ello, en un mismo día se registraron un total de diez mezclas conteniendo ENO (60 ng/mL), OFLO (100 ng/mL), CIPRO (100 ng/mL) y NOR (100 ng/mL). En la tabla VII. 20 se han resumido los valores calculados para las áreas medias, así como los parámetros cromatográficos de la separación optimizada.

Tabla VII. 20.- Repetitividad del método en un mismo día.

ANALITO	ENO	NOR	CIPRO	OFLO
Compuesto separado	ENO*	NOR*	CIPRO*	OFLO
Área media	10,3 (±1,9)	75,6 (±3,7)	80,4 (±4,6)	13,4 (±1,7)
t _R (min)	4,687 (±0,069)	5,261 (±0,084)	6,360 (±0,110)	8,874 (±0,124)
W _{1/2} (min)	0,206 (±0,003)	0,236 (±0,007)	0,290 (±0,01)	0,398 (±0,022)
Resolución	-----	1,30 (±0,02)	2,08 (±0,04)	3,65 (±0,12)

Como se puede observar, se obtienen unos adecuados valores de resolución en todos los casos.

En la siguiente figura VII. 31, podemos observar el mapa de contorno correspondiente a la proyección bidimensional de la matriz global Intensidad de fluorescencia – longitud de onda de emisión (nm)- tiempo, para la separación cromatográfica de una muestra conteniendo los cuatro analitos estudiados.

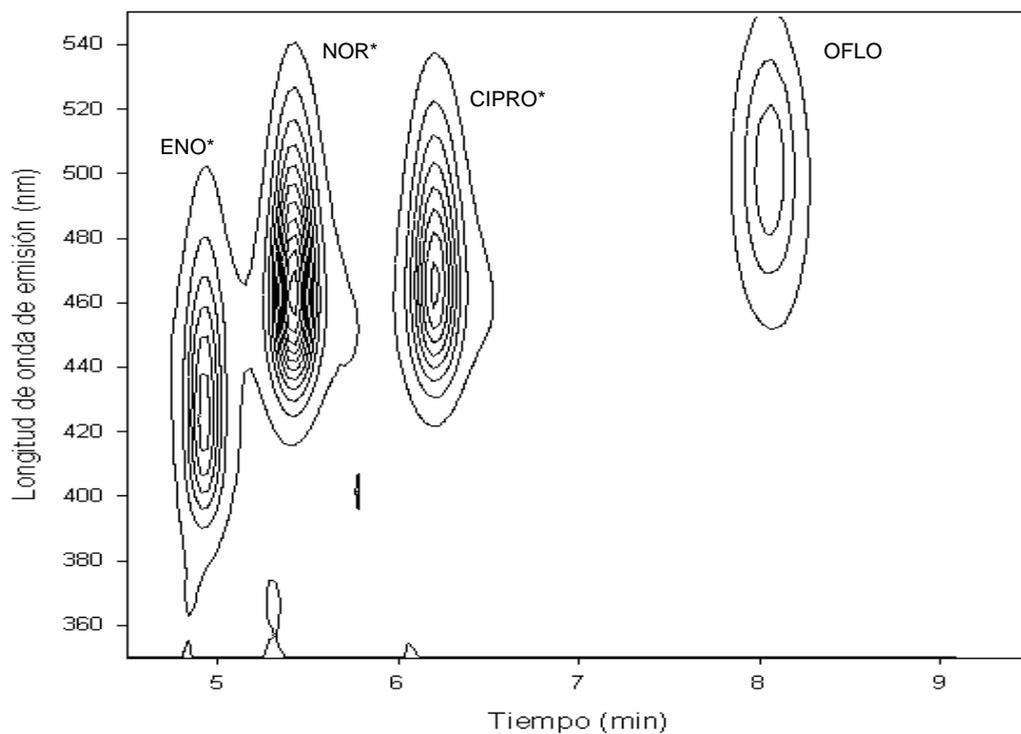


Figura VII. 31.- Proyección bidimensional de la matriz fluorescente de emisión-tiempo a λ_{exc} 277 nm.

6. Determinación de ENO, NOR, CIPRO y OFLO en orina, previa irradiación.

El procedimiento cromatográfico anteriormente descrito ha sido aplicado a la determinación de los analitos objeto de estudio en orina.

Como se ha indicado anteriormente, las fluoroquinolonas estudiadas se eliminan principalmente por vía urinaria, de modo que la concentración de estos analitos en orina es elevada.

Orinas procedentes de individuos de edades comprendidas entre 25–30 años, se contaminaron de forma apropiada con los analitos estudiados, de manera que la concentración de principios activos en la orina fuese del orden de los encontrados en muestras procedentes de terapias (50 µg/mL). Se toma 1.0 mL de esta orina contaminada en 25 mL y, posteriormente, 0.5 mL de esta disolución intermedia se llevan a 10 mL. Estos 10 mL se irradian durante 10 minutos, mediante el empleo de una lámpara UV de alta potencia.

Una vez irradiado, una alícuota de 5 mL de esta disolución se lleva a un matraz de 10 mL, enrasando con el tampón fosfato anteriormente descrito. En la siguiente figura VII. 32 mostramos un cromatograma de orina sin contaminar y de una orina contaminada.

La mayor ventaja de este procedimiento es el incremento notable de la sensibilidad del ENO. Al irradiar podemos llevar a cabo la determinación de ENO a las concentraciones fisiológicas, conjuntamente con las otras fluoroquinolonas estudiadas.

En las figuras VII. 33 a VII. 36 se muestran las calibraciones mediante adición patrón para las fluoroquinolonas en estudio. Por otra parte, los parámetros estadísticos mostrados en las Tablas VII.21 a VII. 24, ponen de manifiesto los adecuados valores obtenidos. Los valores de recuperación se pueden considerar como satisfactorios en todos los casos.

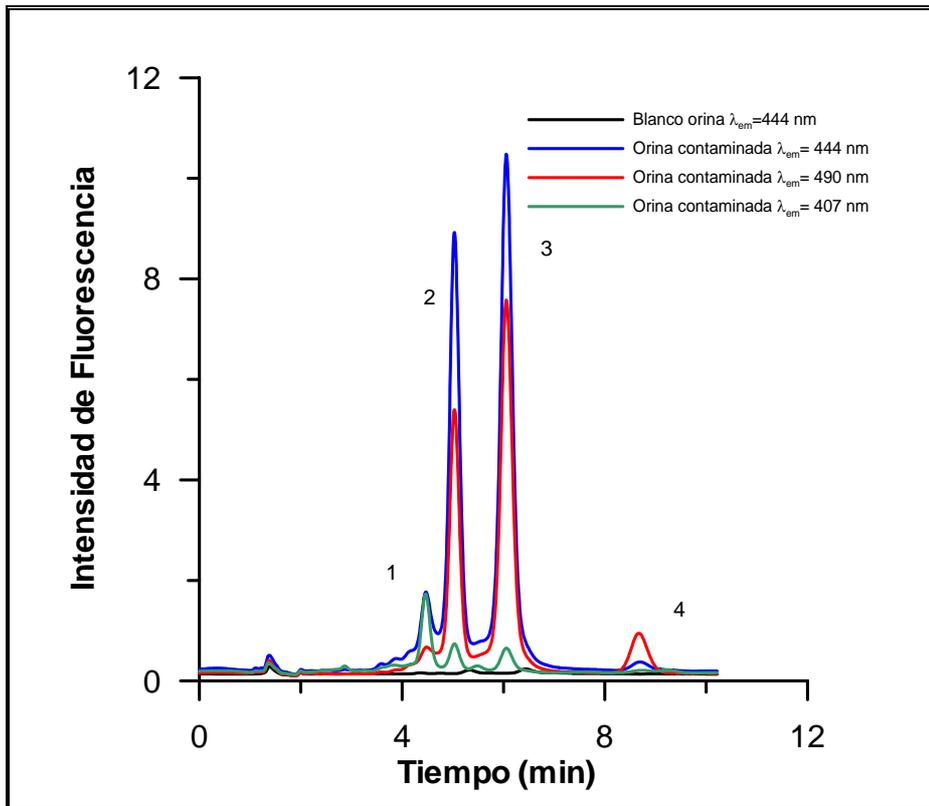


Figura VII. 32.- Cromatograma de orinas contaminadas y sin contaminar obtenidos a diferentes longitudes de onda de emisión en las condiciones experimentales propuestas (ENO*:1; NOR*:2; CIPRO*:3 y OFLO: 4).

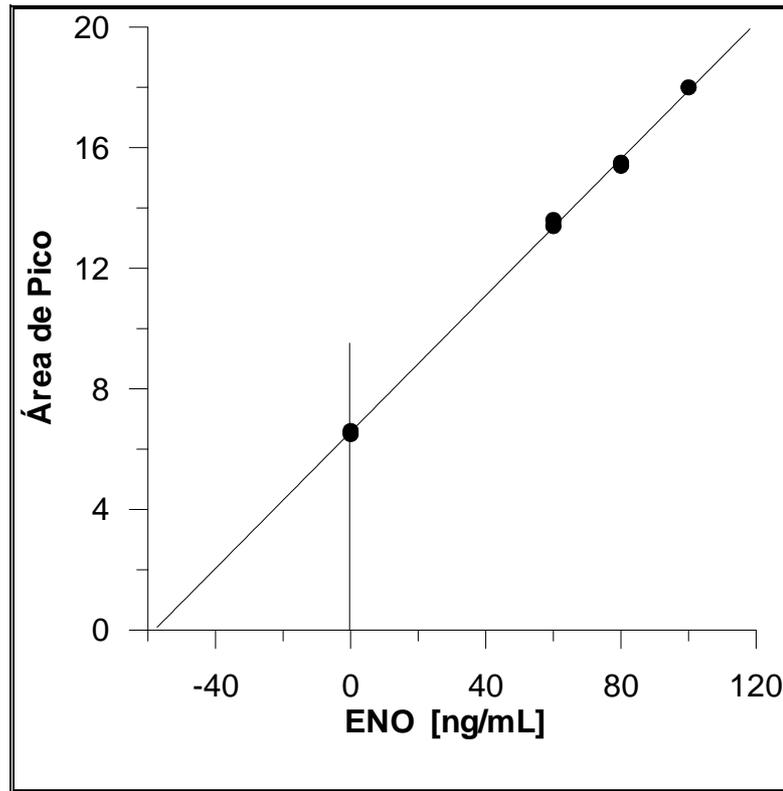


Figura VII. 33.- Recta de adición patrón para ENO en orina irradiada ($\lambda_{ex}=277\text{nm}$, $\lambda_{em}=407\text{nm}$).

Tabla VII. 21.- Recta de calibrado de adición de patrón para ENO en orina irradiada.

RECTA DE ADICIÓN DE PATRÓN
Área pico = $0.1132 \cdot [\text{ENO}] + 6.5707$
$\sigma_{\text{pendiente}} = 0.002$
$\sigma_{\text{ordenada}} = 0.114$
$\sigma_{\text{Estimada}} = 0.1691$
$r = 0.999$
$[\text{Eno}] = 58.1 \text{ ng/mL (R=116 \%)}$

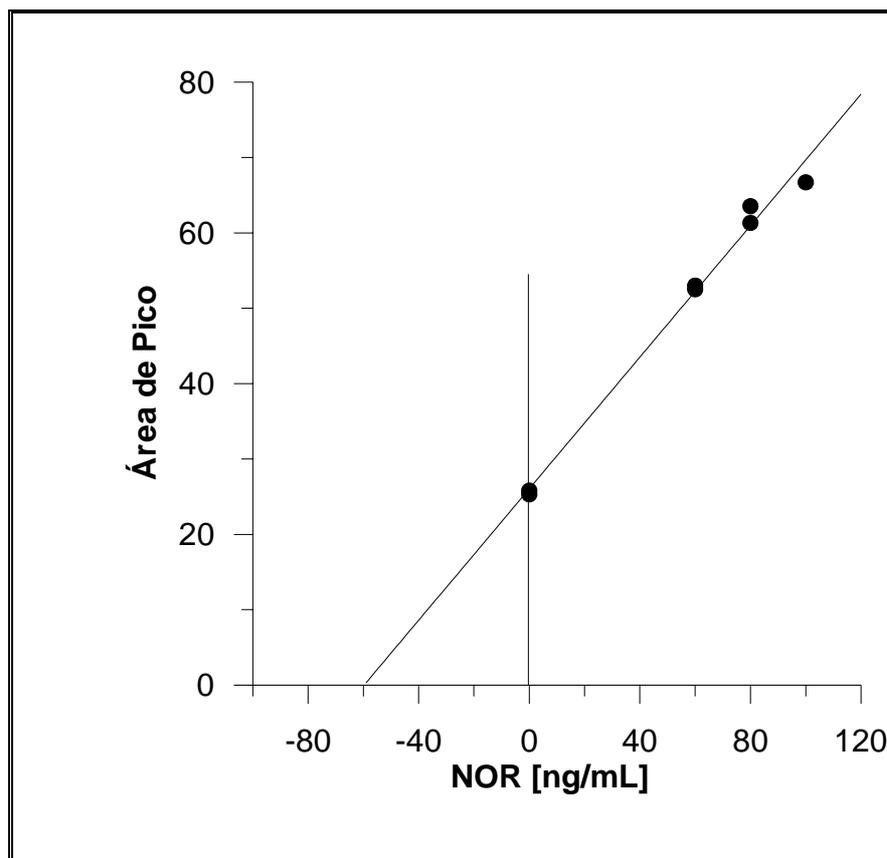


Figura VII. 34.- Recta de adición de patrón para NOR en orina irradiada ($\lambda_{ex}=277\text{nm}$, $\lambda_{em}=444\text{ nm}$).

Tabla VII. 22.- Rectas de adición de patrón para el NOR en orina irradiada.

RECTA DE ADICIÓN DE PATRÓN
Área pico = $0.4362 \cdot [\text{NOR}] + 26.0528$
$\sigma_{\text{pendiente}} = 0.019$
$\sigma_{\text{ordenada}} = 1.2447$
$\sigma_{\text{Estimada}} = 1.8405$
$r = 0.995$
$[\text{Nor}] = 59.7\text{ ng/mL}$ (R=119 %)

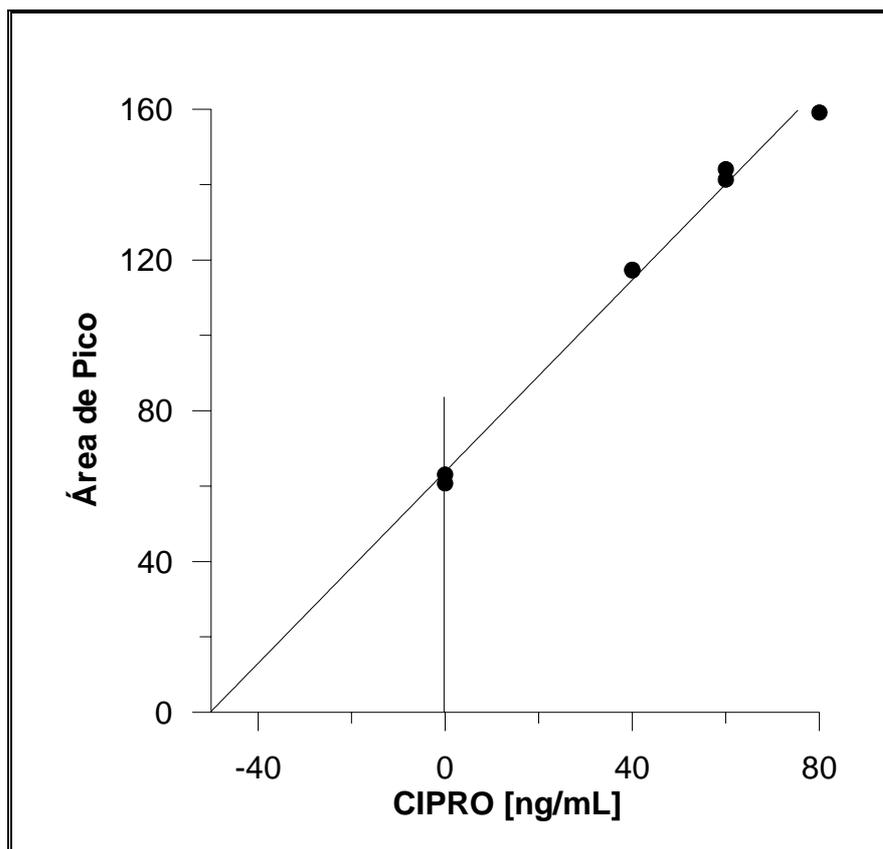


Figura VII. 35.- Recta de adición de patrón para el CIPRO en orina irradiada ($\lambda_{\text{ex}}= 277\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}}= 444\text{nm}$).

Tabla VII. 23.- Rectas de adición de patrón para el CIPRO en orina irradiada.

RECTA DE ADICIÓN DE PATRÓN
Área pico = $1.2718 \cdot [\text{CIPRO}] + 63.824$
$\sigma_{\text{pendiente}} = 0.0544$
$\sigma_{\text{ordenada}} = 2.6631$
$\sigma_{\text{Estimada}} = 4.068$
$r = 0.996$
$[\text{CIPRO}] = 50.2 \text{ ng/mL (R=100 \%)}$

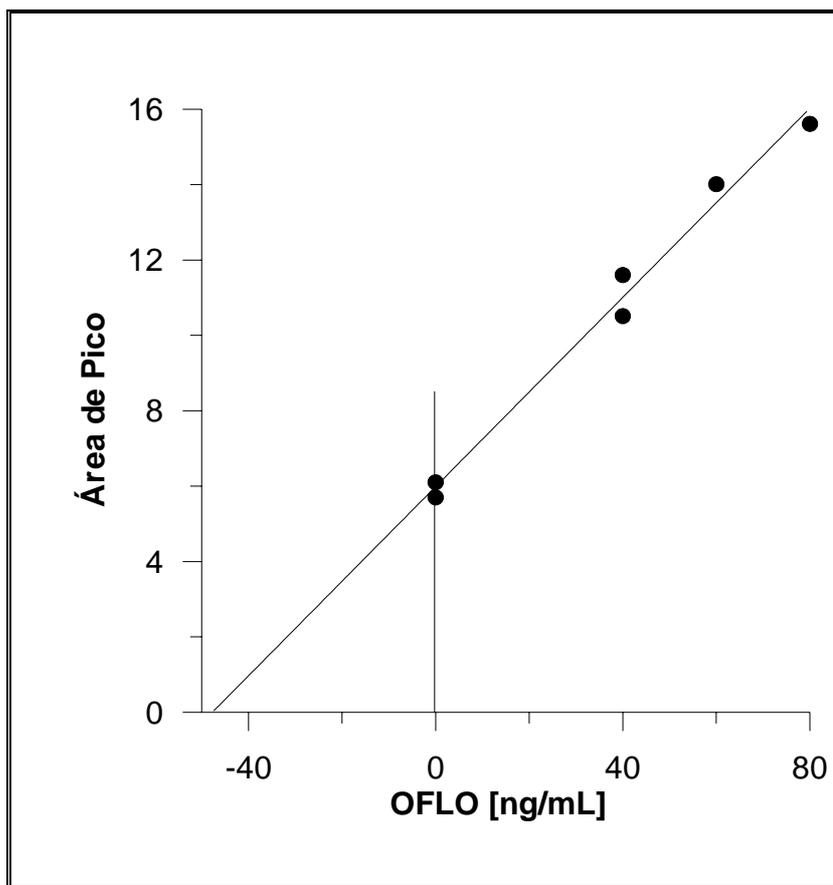


Figura VII. 36.- Recta de adición de patrón para OFLO en orina irradiada ($\lambda_{ex}= 277nm$, $\lambda_{eem}= 490 nm$).

Tabla VII. 24.- Recta de adición de patrón para OFLO en orina irradiada.

RECTA DE ADICIÓN DE PATRÓN
Área pico = $0.1255 \cdot [OFLO] + 5.9857$
$\sigma_{pendiente} = 0.007$
$\sigma_{ordenada} = 0.3450$
$\sigma_{Estimada} = 0.527$
$r = 0.996$
$[OFLO] = 48.0 \text{ ng/mL (R=95 \%)}$

Cuando se realiza el test de la elipse a las regresiones correspondientes a la adición patrón, considerando las concentraciones encontradas frente a puestas (Figura VII. 37), se obtiene en todos los casos la inclusión en la elipse de probabilidad del punto 0,1, poniendo de manifiesto la ausencia del efecto matriz estadísticamente considerable debido a la orina.

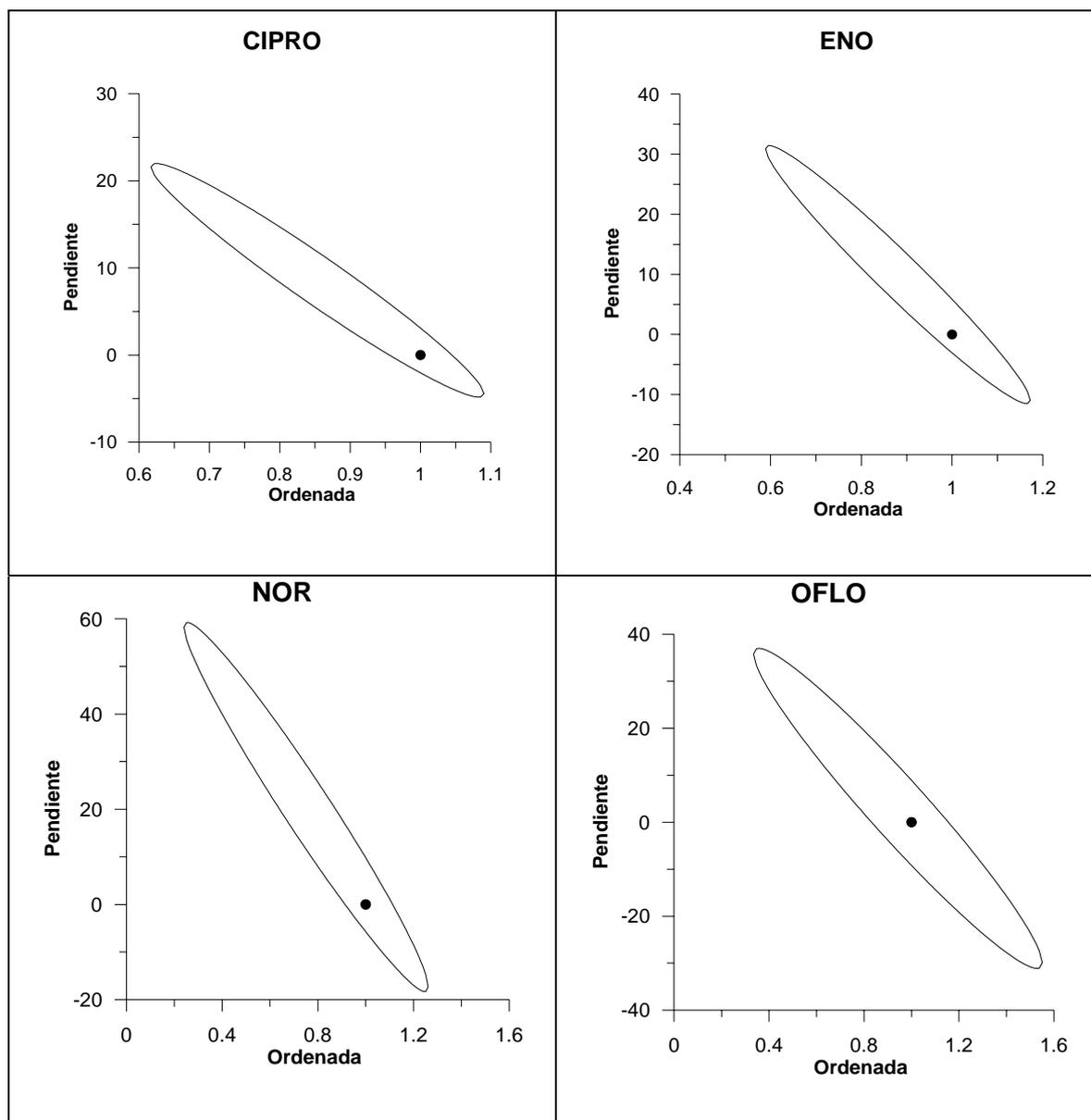


Figura VII. 37.- Test de la elipse para las adiciones patrón en orina irradiada.

7. Determinación de ENO, NOR, CIPRO y OFLO en suero plasmático previa irradiación.

Del mismo modo que lo realizado para la orina, se aplicó el método cromatográfico propuesto a la determinación de estos principios activos en suero plasmático. Como se indicó anteriormente las concentraciones fisiológicas en suero se encuentran comprendidas entre 0-5 $\mu\text{g/mL}$.

Dado que el proceso de irradiación se lleva a cabo en un medio hidroalcohólico, se produce una precipitación parcial de las proteínas presentes en el suero.

Con objeto de incrementar la resolución entre los picos producidos por los componentes del suero, se modificó la proporción de THF en la fase móvil, de un 4% a un 3%, consiguiéndose con ello un incremento notable de la separación.

El procedimiento para la preparación de las muestras ha sido el siguiente:

A sueros procedentes de individuos sanos, se adicionan las fluoroquinolonas objeto de estudio, de manera que las concentraciones de éstas fueran de 1.0 $\mu\text{g/mL}$ en el suero inicial. El suero inicial enriquecido se diluye 10 veces antes de la irradiación y, una vez irradiada la muestra, se toma una alícuota de la misma de 5.0 mL, llevándose a 10 mL enrasando con tampón fosfato (30.0 mM a pH 3.05). Las muestras se centrifugan durante 10 minutos a 10 g y se filtran a través de un filtro de 0.22 μm de tamaño de poro, antes de inyectar en el sistema cromatográfico. La concentración de los principios activos en la muestra de suero preparada es de 50.0 ng/mL.

En la figura VII.38 podemos observar el cromatograma de una muestra de suero enriquecido

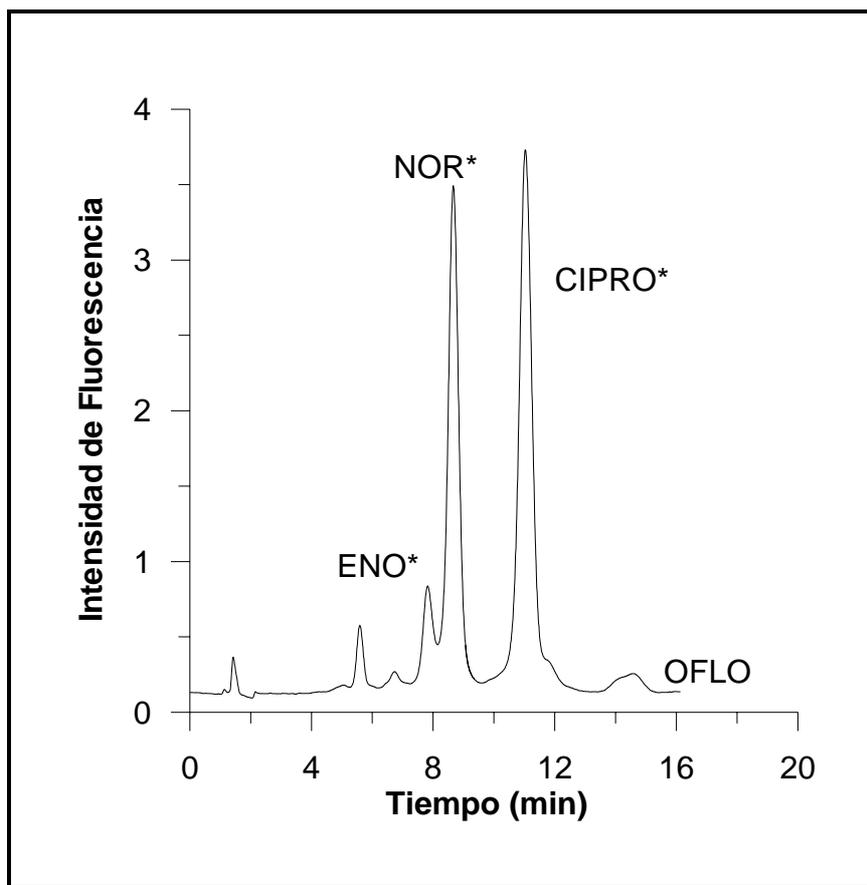


Figura VII. 38.- Cromatograma de una muestra de suero contaminada con ENO, NOR, CIPRO y OFLO ($\lambda_{\text{ex}}= 277\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}}= 444\text{nm}$).

Los picos correspondientes a NOR, CIPRO y OFLO aparecen bien definidos y resueltos, mientras que el ENO aparece relativamente solapado con NOR. Estos dos primeros picos se pueden analizar adecuadamente considerando la posibilidad de emplear las diferencias espectrales y determinar cada uno a su longitud de onda de emisión más favorable, haciendo uso del detector fluorescente de barrido rápido.

Con objeto de establecer la viabilidad de la determinación de estas fluoroquinolonas, se aplica la metodología de la adición patrón. En las siguientes Figuras VII. 39 a VII. 42, se muestra las representaciones de las calibraciones obtenidas mediante dicha metodología. Los parámetros estadísticos relacionados se resumen asimismo en las tablas VII.25 a VII. 28.

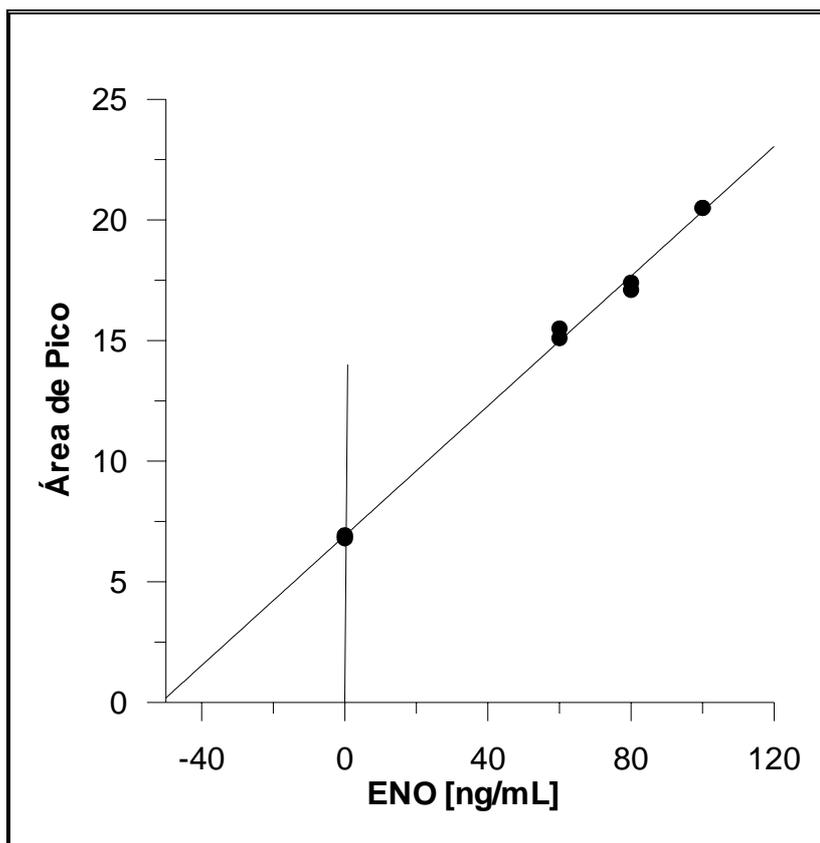


Figura VII. 39.- Recta de adición de patrón para el ENO en suero plasmático irradiado ($\lambda_{ex}= 277\text{nm}$, $\lambda_{em}= 407\text{nm}$).

Tabla VII. 25.- Recta de adición de patrón para el ENO en suero plasmático irradiado.

RECTA DE ADICIÓN DE PATRÓN
$\text{Área pico} = 0.1345 \cdot [\text{ENO}] + 6.9098$
$\sigma_{\text{pendiente}} = 0.003$
$\sigma_{\text{ordenada}} = 0.2337$
$\sigma_{\text{Estimada}} = 0.3498$
$r = 0.998$
$[\text{ENO}] = 51.3 \text{ ng/mL (R=103 \%)}$

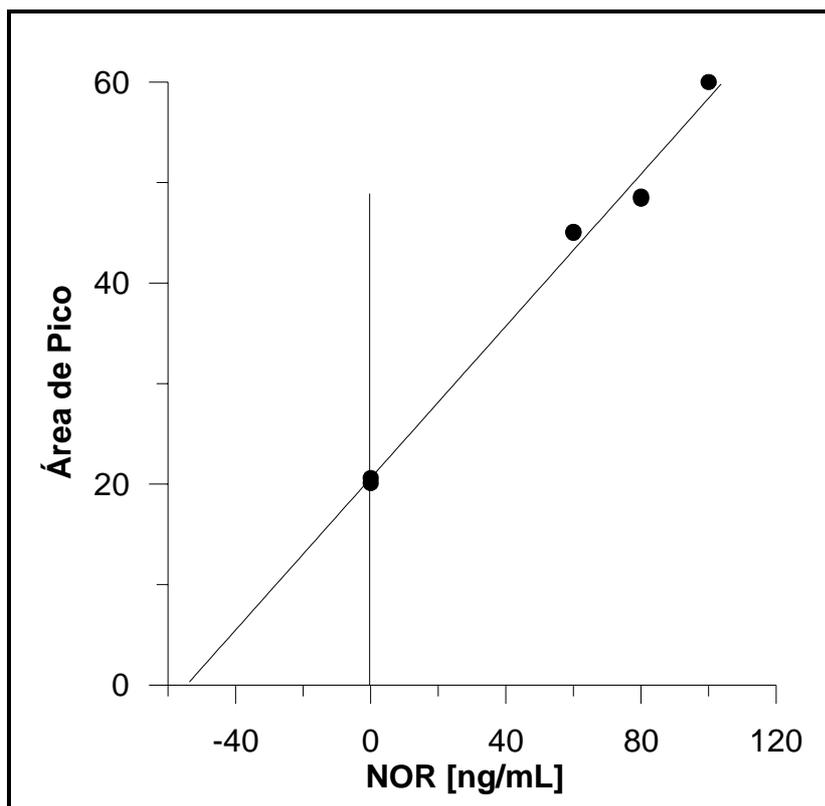


Figura VII. 40.- Recta de adición de patrón para NOR en suero plasmático irradiado ($\lambda_{ex}= 277nm$, $\lambda_{em}= 444nm$).

Tabla VII. 26.- Recta de adición de patrón para el norfloxacin en suero plasmático irradiando

RECTA DE ADICIÓN DE PATRÓN
Área pico = $0.3780 \cdot [NOR] + 20.5933$
$\sigma_{pendiente} = 0.021$
$\sigma_{ordenada} = 1.3543$
$\sigma_{Estimada} = 2.003$
$r = 0.993$
$[NOR] = 54.4 \text{ ng/mL (R=109 \%)}$

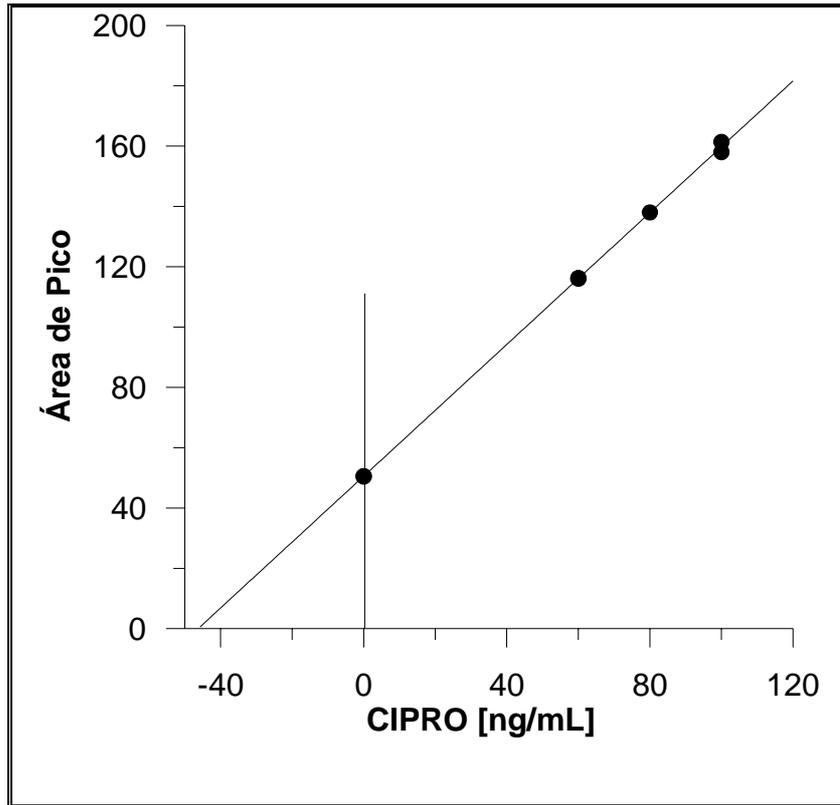


Figura VII. 41.- Recta de adición de patrón para CIPRO en suero plasmático irradiado(λ_{ex} = 277nm, λ_{em} = 444nm).

Tabla VII. 27.- Recta de adición de patrón para CIPRO en suero plasmático irradiado.

RECTA DE ADICIÓN DE PATRÓN
Área pico = 1.0923*[CIPRO]+50.545
$\sigma_{pendiente}$ = 0.0105
$\sigma_{ordenada}$ = 0.7242
$\sigma_{Estimada}$ = 1.0834
r = 0.999
[CIPRO] = 46.3 ng/mL (R=93 %)

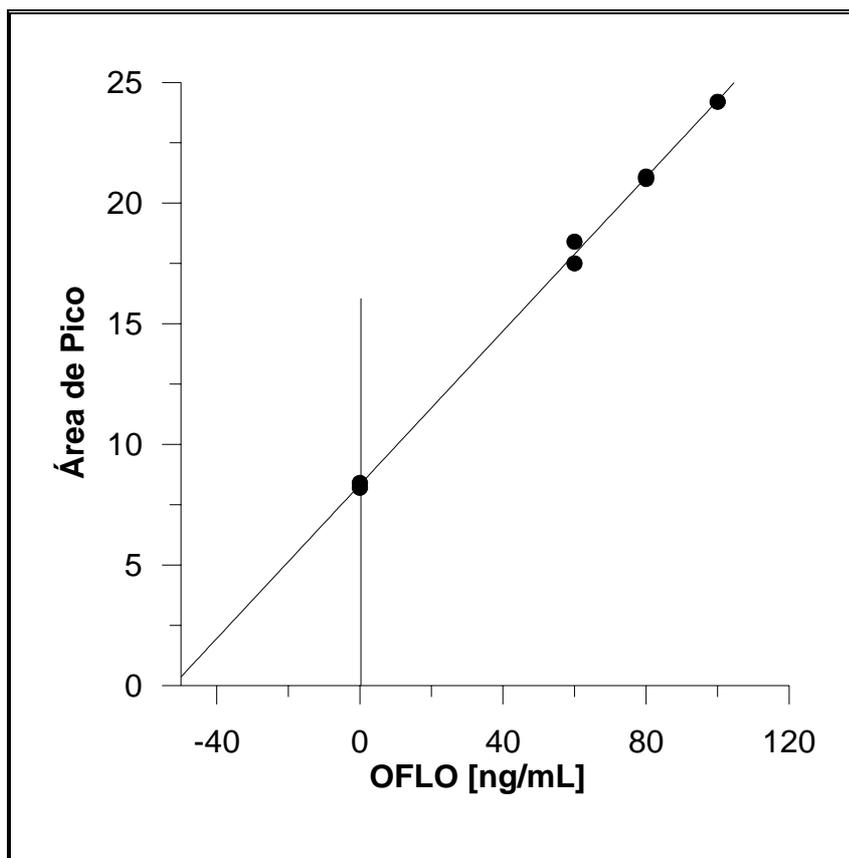


Figura VII. 42.- Recta de adición de patrón para OFLO en suero plasmático irradiado ($\lambda_{ex}= 277\text{nm}$, $\lambda_{em}= 490 \text{ nm}$).

Tabla VII. 28.- Recta de adición de patrón para OFLO en suero plasmático irradiado.

RECTA DE ADICIÓN DE PATRÓN
$\text{Área pico} = 0.1593 \cdot [\text{OFLO}] + 8.3238$
$\sigma_{\text{pendiente}} = 0.003$
$\sigma_{\text{ordenada}} = 0.2015$
$\sigma_{\text{Estimada}} = 0.298$
$r = 0.999$
$[\text{OFLO}] = 52.2 \text{ ng/mL (R = 104 \%)}$

En todos los casos los valores de recuperación son adecuados, oscilando los valores de recuperación entre el 109 del NOR y el 103 % del ENO. Los coeficientes de correlación son al menos del 0.99 en todos los casos.

Por último, un análisis conjunto de la varianza para la ordenada y la pendiente de la regresión encontrado frente a puesto (Figura VII. 43), pone de manifiesto la no existencia de efecto matriz significativo en todos los casos.

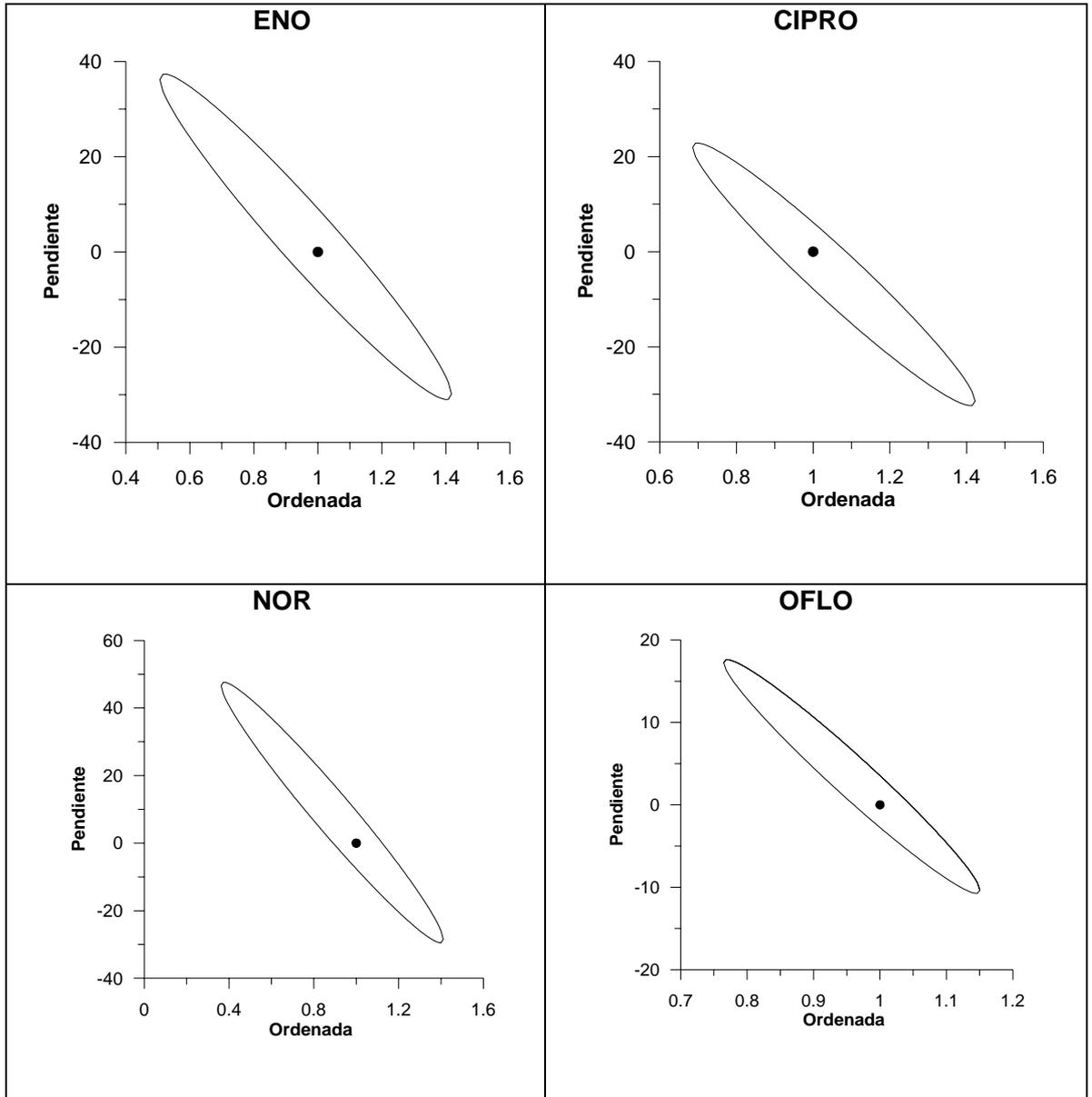


Figura VII. 43.- Test de la elipse para la metodología de la adición patrón en suero enriquecido e irradiado.

8. Comparación entre las metodologías basadas en irradiación previa y en seguimiento de fluorescencia nativa

El proceso de irradiación puede ser justificado en base al notable incremento de sensibilidad obtenido para el ENO, permitiendo entonces su determinación tanto en suero como en orina, de forma conjunta con las otras fluoroquinolonas de interés.

En muestras irradiadas, tanto orina como suero, se pueden separar y determinar en una única muestra ENO, OFLO, NOR, y CIPRO, no siendo posible determinar ENRO debido a que genera varios compuestos en su fotodegradación; mientras que sin irradiación se pueden analizar solo OFLO, ENRO y NOR, ya que ENO no alcanza la suficiente sensibilidad, siendo necesario determinarlo en una segunda muestra de menor dilución.

De forma complementaria, irradiando y sin irradiar, por tanto, se pueden determinar las 5 fluoroquinolonas, tanto en suero como en orina.

En la siguiente tabla se comparan ambos métodos.

	ENO		NOR		OFLO		CIPRO		ENRO	
	S. Irr.	Irr.	S.Irr.	Irr.	S.Irr.	Irr.	S.Irr.	Irr.	S.Irr.	Irr.
Pendiente	20.8 ^a	0.146 ^c	0.231 ^c	0.73 ^c	0.18 ^c	0.11 ^c	--	1.06 ^d	0.487 ^c	--
Ordenada	3.85	0.001	10.43	-1.5	2.86	1.05	--	-1.58	1.86	--
L.D. W-L	0.31 ^b	4.87 ^d	9.61 ^d	3.96 ^d	17.9 ^d	10.0 ^d	--	3.97 ^d	9.75 ^d	--
L.D. Clayton	0.45 ^b	7.35 ^d	14.7 ^d	6.03 ^d	25.22 ^d	14.5 ^d	--	6.35 ^d	15.0 ^d	--
Sens. Anal.	0.14 ^b	2.23 ^d	4.32 ^d	1.82 ^d	6.28 ^d	3.71 ^d	--	2.09 ^d	4.38 ^d	--

^a UFmL/ μ g

^b μ g/mL

^c UFmL/ng

^d ng/mL

Capítulo VIII.

Determinación de carbamacepina en suero plasmático y formulaciones farmacéuticas utilizando inmovilización en soporte de nylon, detección fluorimétrica y técnicas quimiométricas

1. Introducción

El desarrollo de nuevas metodologías encaminadas a la determinación de analitos de interés bioquímico y clínico en matrices complejas, fundamentalmente en fluidos biológicos, es uno de los objetivos que nos planteamos en esta Memoria.

La baja concentración presente de la mayoría de estos compuestos hace necesario desarrollar métodos que presenten una elevada sensibilidad y selectividad. En esta tesis doctoral, se han descrito ya diferentes métodos encaminados a incrementar la sensibilidad.

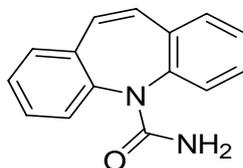
Así, en capítulos anteriores se han desarrollado metodologías con el empleo de agentes tensoactivos que producen una notable mejora en las propiedades fluorescentes en estudio, concretamente en las fluoroquinolonas, debido a la interacción con las micelas formadas. Posteriormente, se han establecido métodos basados en el efecto de la irradiación externa UV sobre estas mismas fluoroquinolonas, provocando del mismo modo un incremento notable de su fluorescencia y, por tanto, de la sensibilidad.

En este capítulo presentamos el desarrollo de una nueva metodología basada en la utilización de una membrana sólida, concretamente membranas de nylon, como medio de soporte de la muestra que se va a analizar y medidas in situ de la fluorescencia generada. Dicha metodología ha sido desarrollada para llevar a cabo el análisis del anticonvulsivo carbamacepina y de su principal metabolito en suero humano.

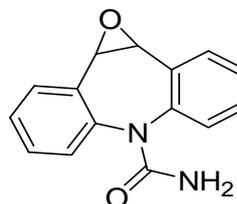
Esta determinación se ha llevado a cabo, tanto de forma independiente para el análisis de ambos principios activos en fármacos, como de forma simultánea en suero plasmático.

El desarrollo de este trabajo ha sido llevado a cabo en colaboración con la Cátedra de Química Analítica de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y farmacéuticas de la Universidad de Rosario (Argentina). Este grupo de investigación ha estado desarrollando, en tiempos recientes, nuevas metodologías analíticas basadas en la emisión de luminiscencia, con el propósito de determinar diferentes fármacos en composiciones farmacéuticas y fluidos biológicos.

La carbamacepina es un principio activo ampliamente utilizado para el tratamiento de epilepsia y enfermedades mentales¹. Se metaboliza de forma muy eficaz en el organismo, y tan solo se eliminan trazas de la misma por vía urinaria. Su principal metabolito, CBZ-epóxido, presenta también actividad farmacológica como anticonvulsivo² y, por tanto, su determinación en suero es tan importante como la determinación de la propia carbamacepina.



5H-dibenzo[*b,f*]azepine-5-carboxamida



Carbamacepina 10,11 epóxido

En este capítulo presentamos los resultados obtenidos en el desarrollo de una nueva metodología que nos ha permitido determinar de forma simultánea carbamacepina (CBZ), y el epóxido 10,11-epóxido de CBZ, su principal metabolito.

¹ Goodman Gilman, J.G.; Hardman, J.G.; Limbrid, L.E.; *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*, 10th ed. Mc-Graw Hill, N.Y. 2001

² Shibukawa, A.; He, J.; Nakagawa, T.; *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 10, 289, 1992

La estrategia seguida en este trabajo, ha sido depositar la carbamacepina y su epóxido sobre una membrana de nylon y, posteriormente, llevar a cabo las medidas de fluorescencia sobre la propia superficie. La fijación de estos analitos sobre el nylon genera interacciones que favorecen el proceso de emisión fluorescente, ya que por si solos en disolución dichos compuestos no presentan fluorescencia apreciable.

Tanto la carbamacepina como su epóxido presentan un perfil de emisión muy similar, con grandes solapamientos. Se ha abordado su determinación mediante la utilización de calibración multivariante de segundo orden, empleando matrices de excitación emisión fluorescente y se han comparado los resultados con aquellos obtenidos mediante calibración multivariante de primer orden, cuando se emplean los espectros de emisión como señales analíticas.

Antecedentes bibliográficos.

Se han propuesto diferentes métodos para la determinación conjunta de estas dos especies, principalmente mediante la aplicación de técnicas cromatográficas^{3,4}.

En la bibliografía no se encuentran métodos que empleen soporte sólido para la determinación fluorimétrica de estos derivados. Por otra parte, es de destacar que es la primera vez que se utiliza al nylon como material de soporte para estudios fluorimétricos.

³ Bhaffi, M.M.; Hanson, G.D.; Schultz, L.; *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 16, 1233, 1998

⁴ Mandrioli, R.; Albani, F.; Casamenti, G.; Sabbioni, C.; Raggi, M.A.; *Journal of Chromatography B*, 762,109, 2001

Con la excepción de algunos trabajos recientes ^{5, 6, 7} desarrollados por el mismo equipo investigador, la aplicación de matrices tridimensionales de excitación emisión fluorescente en muestras de fluidos biológicos es escasa. De este modo, el trabajo desarrollado en este capítulo puede contribuir a la comparación de las ventajas y limitaciones de los diferentes algoritmos, que se encuentran disponibles para la resolución de muestras complejas

En la bibliografía existen escasos antecedentes del empleo de membranas como soporte para medidas in situ de fluorescencia y, en todo caso, emplean habitualmente membranas de C-18.

Así, Hagestuen y col.⁸ proponen la utilización de membranas de C-18, para la determinación de hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs) en muestras de agua, mediante fosforescencia a temperatura ambiente (RTP). Proponen hacer pasar las muestras a través de membranas previamente acondicionadas, posterior adición de disolución de una sal del metal (TI), secado a 110°C y medidas de la fosforescencia. Dicha metodología permite alcanzar límites de detección de $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ para pireno, benzopireno, fenantreno y otros derivados de estructura similar.

Whitcomb y col.⁹ proponen un método para la medida de fluorescencia en fase sólida a temperatura ambiente, para la determinación de hidrocarburos policíclicos aromáticos, obteniendo límites de detección del orden de pg/mL . Las medidas de fluorescencia las realizan empleando un soporte no comercial.

Posteriormente, Escandar y col. ¹⁰ proponen diferentes metodologías para la determinación de piroxicam y pirodoxina. En este trabajo combinan la extracción en fase sólida mediante la utilización de membranas C18 y posterior medida de la fluorescencia en la propia membrana.

⁵ Arancibia, J.A.; Olivieri, A.C.; Escandar, G.M.; *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 374, 451, 2002

⁶ Hagert, L.A.; Escandar, G.M.; *Talanta*, 60, 235, 2003

⁷ Muñoz de la Peña, A.; Espinosa Mansilla, A.; González Gómez, D.; Olivieri, A.C.; Goicoechea, H.C.; *Analytical Chemistry*, 75, 2640, 2003

⁸ Hagestuen, E.D.; Arruda, A.F.; Campiglia, A.D.; *Talanta*, 52, 727, 2000

⁹ Whitcomb, J.L.; Campiglia, A.D.; *Talanta*, 55, 509, 2001

¹⁰ Escandar, G.M.; Bystol, A.J.; Campiglia, A.D.; *Analytica Chimica Acta*, 466, 275, 2002

Finalmente Escandar y col.¹¹ proponen metodologías para la determinación de piroxican en suero plasmático, comparando métodos quimiométricos con técnicas de separación en fase sólida.

Modo de preparación de las muestras e instrumental empleado.

Las medidas de fluorescencia se realizaron mediante el empleo de un espectrofluorímetro Aminco Bowman Series 2, equipado con una lámpara de Xenón de 150 W. Dicho instrumento estaba conectado a un ordenador personal Pentium PC mediante una interface GPIB. Para las medidas de la fluorescencia en disolución se empleó una cubeta de cuarzo y una anchura de rendija de 8 nm. Para las medidas de la fluorescencia sobre las membranas, se utilizó un soporte no comercial como el mostrado en la siguiente figura realizado en metal. En la parte central presenta una cavidad circular, donde se coloca de forma oportuna el disco de nylon donde se encuentra depositada la muestra.

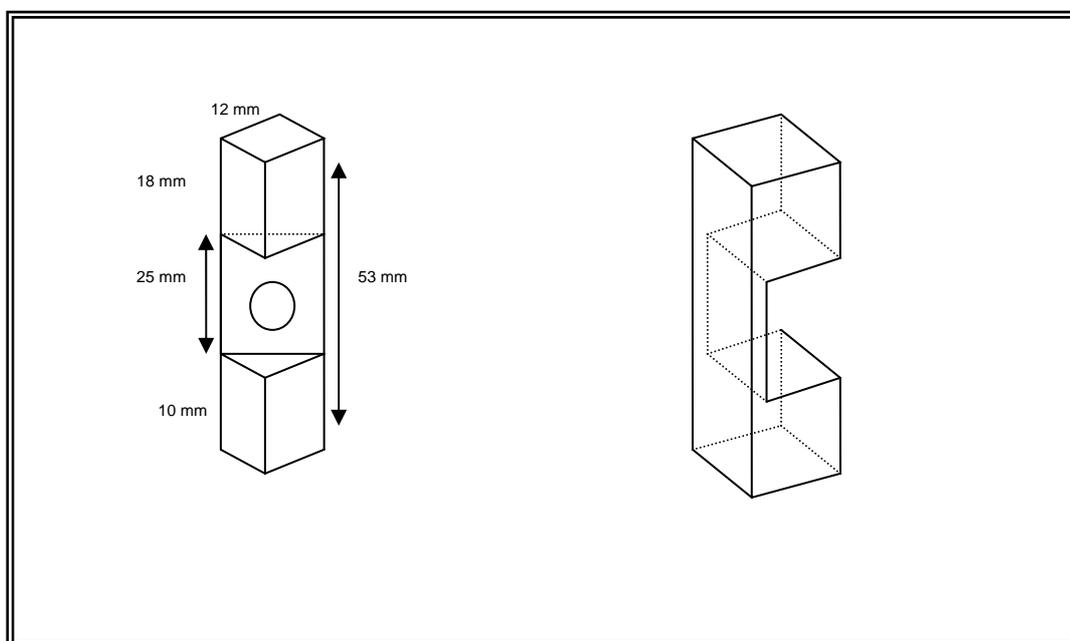


Figura VIII. 1.- Portamembranas para espectrofluorímetro AMINCO

¹¹ Escandar, G.M.; Arancibia, J.A.; *Talanta*, 60, 1113, 2003

Las membranas de nylon utilizadas presentan un tamaño de poro de 0.2 μm y un diámetro de 8 mm. En estas membranas se deposita 7 μL de disolución, ya sea de CBZ ó CBZ-EP en hexano. Una vez depositada la muestra, el disolvente se evapora mediante un chorro de aire. En estas condiciones la membrana se deposita sobre el soporte portamembrana descrito anteriormente, de manera que la radiación de excitación incide en un ángulo de 90° sobre la misma.

Para la determinación de CBZ utilizando métodos quimiométricos de primer orden, las longitudes de onda de excitación y emisión fueron fijadas en 280 y 400 nm, respectivamente. Para la obtención de los espectros del CBZ-EP, las longitudes de onda de los máximos de excitación y emisión fueron de 256 y 430 nm, respectivamente.

Se comprobó que la intensidad de fluorescencia del epóxido se incrementa cuando éste es irradiado durante tres minutos con la lámpara de xenón del espectrofluorímetro, fijando el monocromador de excitación en 256 nm. Este incremento de fluorescencia se mantiene constante durante varios días. También se comprobó que este proceso de irradiación no afecta a la emisión fluorescente de la carbamacepina, cuando se encuentra de forma conjunta con su metabolito. Hay que destacar que se obtuvieron espectros reproducibles en todas las experiencias realizadas.

Para la determinación de carbamacepina en preparaciones farmacéuticas, se construyó la correspondiente curva de calibrado en el rango de 0-7 $\mu\text{g/mL}$.

Fundamento teórico del análisis quimiométrico

Como hemos visto en capítulos anteriores, las matrices de datos tridimensionales, como las de intensidad de fluorescencia-longitud de onda excitación-emisión, pueden ser utilizadas como señales para la optimización de modelos basados en métodos quimiométricos de segundo orden¹².

Se han aplicado, en este trabajo, las metodogías *Parallel Factor Analysis (PARAFAC)*^{13,14}, *Self-Weighted Alternating Trilinear Decomposition (SWALTD)*¹⁵ y *N-way Partial Least-Squares (N-PLS)*¹², ya tratadas en otros capítulos de esta Memoria.

Como se ha indicado anteriormente, cuando la estructura de los datos sigue un comportamiento trilineal, podemos proponer un cubo de datos, como la suma del producto tensorial de tres vectores por cada componente. De modo que si \mathbf{A}_n , \mathbf{B}_n y \mathbf{C}_n son la matriz de las concentraciones relativas ($I \times 1$, I = número de muestras), perfiles de emisión ($J \times 1$, J = número de puntos espectrales) y perfiles de excitación ($K \times 1$) respectivamente, para un componente n ; el cubo de datos, \mathbf{R} , puede escribirse como¹²:

$$\underline{\mathbf{R}} = \sum_{n=1}^N \mathbf{A}_n \otimes \mathbf{B}_n \otimes \mathbf{C}_n + \underline{\mathbf{E}} \quad \text{Ecuación 1}$$

donde \otimes indica producto tensorial, N es el número total de componentes de respuesta, y $\underline{\mathbf{E}}$ es un término de errores residuales, del mismo tamaño de $\underline{\mathbf{R}}$. Los vectores columnas de \mathbf{A}_n , \mathbf{B}_n y \mathbf{C}_n constituyen las tres matrices loading \mathbf{A} , \mathbf{B} y \mathbf{C} . Una propiedad de $\underline{\mathbf{R}}$, es que puede ser descompuesta de forma única, para acceder a los perfiles \mathbf{B} y \mathbf{C} , y a las concentraciones relativas (\mathbf{A}), para un componente individual en las I mezclas, haya o no componentes conocidos químicamente.

¹² Bro. R.; *Multi-way Analysis in the Food Industry*, Tesis Doctoral. Universidad de Amsterdam. 1998

¹³ Harshman, R.A.; *UCLA working papers in phonetics*; 16, 1, 1970

¹⁴ Bro. R.; *Chemometrics Intelligent Systems*; 38, 149, 1997

¹⁵ Chen, Z.P.; Wu, H.L.; Jiang, J.H.; Li, Y.; Yu, R.Q.; *Chemometrics Intelligent Laboratory Systems*, 52, 75, 2000

El algoritmo empleado en PARAFAC esta basado en una minimización mediante el empleo de mínimos cuadrados parciales, mientras que SWALTD utiliza un procedimiento denominado descomposición trilineal alternante. Estos dos procedimientos permiten extraer directamente las concentraciones relativas de un componente individual en presencia de diferentes constituyentes no calibrados. Como hemos indicado en capítulos anteriores, a este hecho se le denomina como *ventaja de segundo orden*¹⁶.

En este trabajo que describimos, esta ventaja se ha aprovechado mediante el empleo de un conjunto de calibración externa, junto con la matriz tridimensional de la muestra incógnita, que pasa a formar parte del conjunto de calibración antes de llevar a cabo la descomposición del cubo de datos. En definitiva, la ventaja de segundo orden se ha conseguido construyendo un modelo articulado tanto por las respuestas del conjunto de calibración como por las de predicción.

Cuando se aplica un método de calibración multivariante, hay que tener en cuenta los siguientes etapas: (a) Cómo evaluar la unicidad del modelo, (b) cómo establecer el número de componentes, (b) cómo identificar un componente específico a partir de la información suministrada por el modelo, (d) cómo calibrar el modelo con objeto de obtener el valor de concentración absoluta para un determinado analito dentro de una muestra incógnita.

Con respecto a la unicidad del modelo, normalmente se comprueba mediante el estudio de los residuos del ajuste por mínimos cuadrados, en definitiva evaluando la matriz de errores (**E**).

La determinación del número óptimo de factores se realiza analizando el parámetro interno *Core Consistency*, propuesto por Bro¹². Este parámetro interno nos proporciona una idea de cómo un modelo es capaz de reproducir la denominada Tucker core de un cubo de datos. Este parámetro presenta un valor cercano a 100 cuando el número de factores es menor o igual al número óptimo; para un número mayor de factores, el valor de consistencia de núcleo cae por debajo del 50 %.

¹⁶ Kowaiski, B.R.; Seasholtz, M.B.; *Journal Chemometrics*, 5, 129, 1991

La identificación de los componentes químicos, se realiza mediante la comparación de los perfiles **B** y **C**, con patrones puros.

Finalmente, los valores de concentración absolutos de los analitos se obtienen después de llevar a cabo una correcta calibración; ya que la descomposición del cubo de datos, tan solo nos proporciona valores de concentraciones relativos (**A**). Existen dos modelos diferentes para llevar a cabo esta labor: el método de adición patrón y patrón externo. En ambos casos se explota la ventaja de segundo orden, ya que la muestra problema, que contiene interferencias no modelables, entra a formar parte del conjunto de calibración.

Con respecto a **N-PLS**, el conjunto de datos de calibración, se descompone en un modelo trilineal, el cual no se ajusta a la idea del modelo de mínimos cuadrados. Siguiendo la filosofía del modelo PLS, N-PLS persigue el propósito de describir la covarianza de las variables independiente (respuesta) y dependiente (concentración). A pesar de que la descomposición del cubo de datos, en este modelo es única; esta unicidad no implica la reconstrucción de los espectros reales de los analitos, por ejemplo, ya que las suposiciones del modelo no reflejan ciertos aspectos teóricos del mismo. Además, N-PLS no aprovecha la ventaja de segundo orden, ya que no dispone de las concentraciones para las muestras desconocidas.

En este trabajo, se han comparado los resultados obtenidos con los algoritmos anteriores, con los que se obtienen al aplicar metodologías que utilizan datos de emisión fluorescente de primer orden, como *Partial Least-Squares (PLS-1)*¹⁷. Como hemos descrito en mayor detalle en capítulos anteriores, PLS-1 conlleva un primer paso de calibración, en el cual la relación existente entre las señales espectrales (espectros bidimensionales de emisión) y la concentración de los analitos, se estima mediante un conjunto de patrones, que constituyen el set de calibración. En la etapa de predicción, los resultados de la calibración se utilizan para estimar la concentración de un determinado componente en la muestra problema. En los métodos de calibración de primer orden, no existe ninguna de las ventajas que se ponen de manifiesto en los métodos de segundo orden.

¹⁷ Martens, H.; Naes, T.; *Multivariate Calibration*, Wiley, Chichester, UK, 1989

Todos los cálculos se realizaron empleando el software MATLAB 5.3¹⁸. Para la aplicación de PLS-1 se desarrolló¹⁹ una rutina siguiendo algoritmos conocidos²⁰. Tanto para N-PLS como para PARAFAC, las rutinas empleadas están disponibles en internet²¹, aunque para este trabajo se utilizó una rutina en MATLAB²², que genera una interface de fácil manejo. Esta rutina nos permite introducir de forma simple los datos en el espacio de trabajo de MATLAB antes de aplicar PARAFAC, SWALTD y N-PLS.

Los perfiles de excitación y emisión calculados se muestran en dos figuras separadas, para permitir la correcta selección del analito de interés. Una vez seleccionado el componente, se puede observar un gráfico de la regresión pseudo univariante²³ correspondiente para este componente. Una vez hecho esto, se muestran en pantalla los resultados de concentración y figuras de mérito.

¹⁸ MATLAB 5.3. *The Math Works, Inc.* Massachusetts, USA, 1999

¹⁹ Olivieri, A.C.; *Cátedra de Química Analítica*. UNR, Rosario, Argentina

²⁰ Haaland, D.M.; Thomas, E.V.; *Analytical Chemistry*, 60, 1193, 1988

²¹ <http://www.models.kvl.dk/source/>

²² Goicoechea, H.C.; Iñón, F.A.; Olivieri, A.C.; *Chemometrics Intelligent Laboratory Systems* 63, 107, 2002

²³ Faber, N.M.; *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 50, 107, 2000

2. Consideraciones experimentales

En este trabajo se ha comprobado que la carbamacepina presenta propiedades fluorescentes en estado sólido. También, se estudiaron las propiedades fluorescentes de este analito en disolución en diferentes disolventes, tales como hexano, benceno, ciclohexano, metanol, agua y tolueno. En todos ellos, la fluorescencia que presentan las disoluciones de carbamacepina es muy débil no siendo de utilidad con fines analíticos.

Aparentemente, el estado singlete excitado de la carbamacepina es capaz de descender a un estado fundamental no radiante, cuando sus moléculas son expuestas a interacciones libres con el disolvente. Por ello, se estudió la posibilidad de obtener fluorescencia cuando el analito se soporta en una superficie sólida.

Naturaleza de la superficie sólida

Se ensayaron superficies sólidas de distinta naturaleza, tales como membranas de C18, celulosa, placas cromatográficas de silica gel, acetato sódico y nylon, concluyéndose que tan solo en nylon, la carbamacepina presenta fluorescencia. En la figura VIII. 2 podemos observar la estructura del nylon.

Empleando membranas procedentes de diferentes lotes se comprobó la repetitividad de las medidas, observándose que en todos los casos se reprodujeron las señales.

El tamaño de poro de las membranas afecta a las señales obtenidas, comprobándose que a medida que éste aumenta, se reduce la adsorción del analito sobre la membrana y, consecuentemente, se produce una disminución de la fluorescencia.

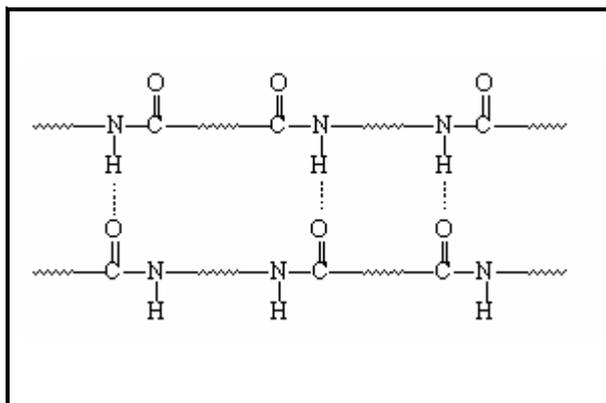


Figura VIII. 2.- Estructura del nylon

Debido a la especial estructura del nylon, estas membranas presentan un carácter hidrofílico, compatible tanto con medios orgánicos como acuosos. El grupo amida, presente en el nylon, guarda cierta similitud con el que se encuentra en la estructura de la carbamacepina. Este hecho podría explicar el fenómeno observado, debido a las interacciones que se producen entre el analito y el soporte, causado por el desplazamiento de algunos de los enlaces de hidrógeno de la membrana de nylon. Existe, por tanto, un requerimiento estructural, tanto para la adsorción sobre la superficie, como para la emisión de fluorescencia de la carbamacepina.

Si suponemos que cada molécula de carbamacepina ocupa aproximadamente 36 \AA^2 de la superficie del nylon (estimado de acuerdo a modelos moleculares), un volumen de 7 \mu L de disolución de CBZ de concentración 8 \mu g/mL , sería suficiente para cubrir la superficie de membranas de 8 mm de diámetro.

Influencia de la naturaleza del disolvente

Se estudió la influencia de la naturaleza del disolvente en el cuál se encuentran disueltos los analitos, en el proceso de adsorción y emisión fluorescente. Como podemos observar en la Figura VIII. 3, el disolvente empleado ejerce una gran influencia sobre la intensidad de fluorescencia.

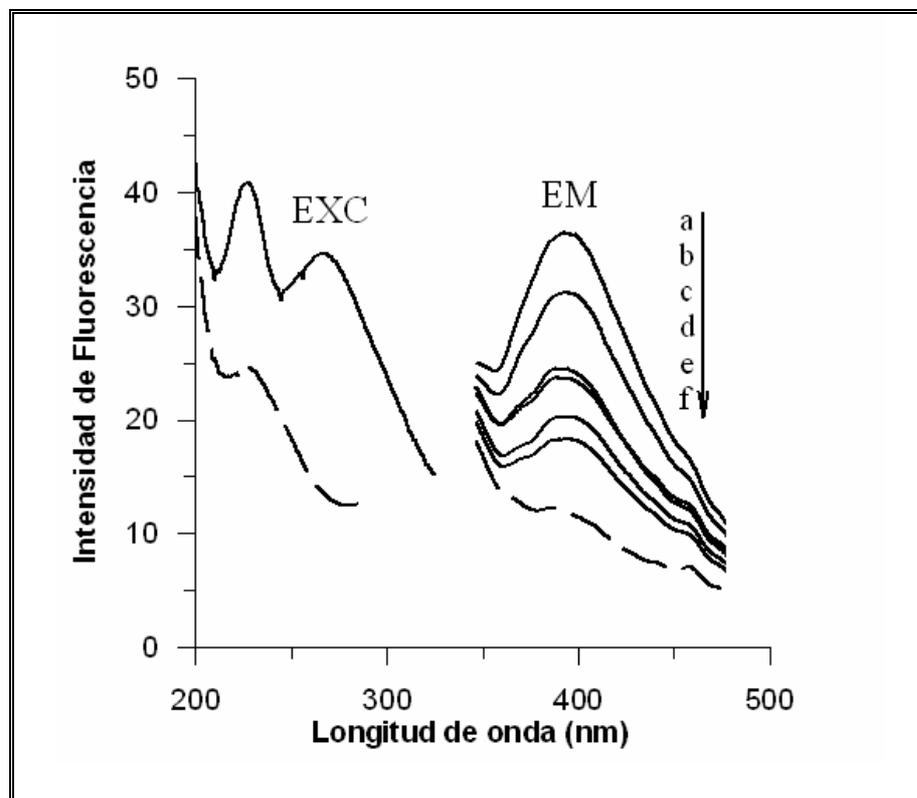


Figura VIII. 3.- Espectros de emisión y excitación de carbamacepina en membrana de nylon, en hexano (a), y espectros de emisión en benceno (b), ciclohexano (c), metanol (d), agua (e) y tolueno (f). $\lambda_{ex} = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 400 \text{ nm}$. $V = 310 \text{ v}$.

A diferencia de la carbamacepina, su metabolito presenta fluorescencia en disolución. En la Figura VIII. 4 se muestran los espectros de excitación y emisión para el epóxido en diferentes disolventes. La fluorescencia se ve favorecida en medios polares y la mayor intensidad de observa en agua.

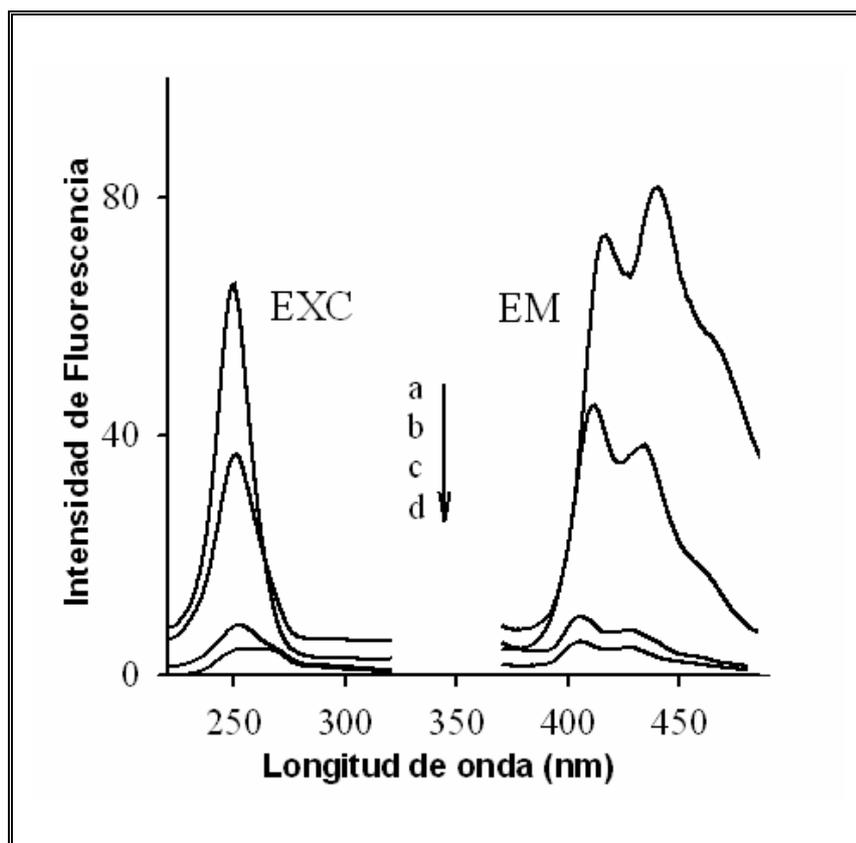


Figura VIII. 4.-Espectros de excitación y emisión para CBZ-EP en agua (a), metanol (b), ciclohexano (c) y hexano (d). [CBZ-EP] = 4.5 $\mu\text{g/mL}$. λ_{ex} = 256 nm, λ_{em} = 430 nm. V = 600v.

Tanto la carbamacepina, como su epóxido, presentan un grupo amida en su estructura, y ambos emiten fluorescencia cuando están fijados sobre una superficie de nylon. En la Figura VIII. 5 se muestran los espectros de excitación y emisión para el CBZ-EP fijado sobre membrana de nylon. Si comparamos con la figura anterior, observamos que no hay diferencias importantes en la morfología de los espectros tanto en disolución, como soportados sobre membrana.

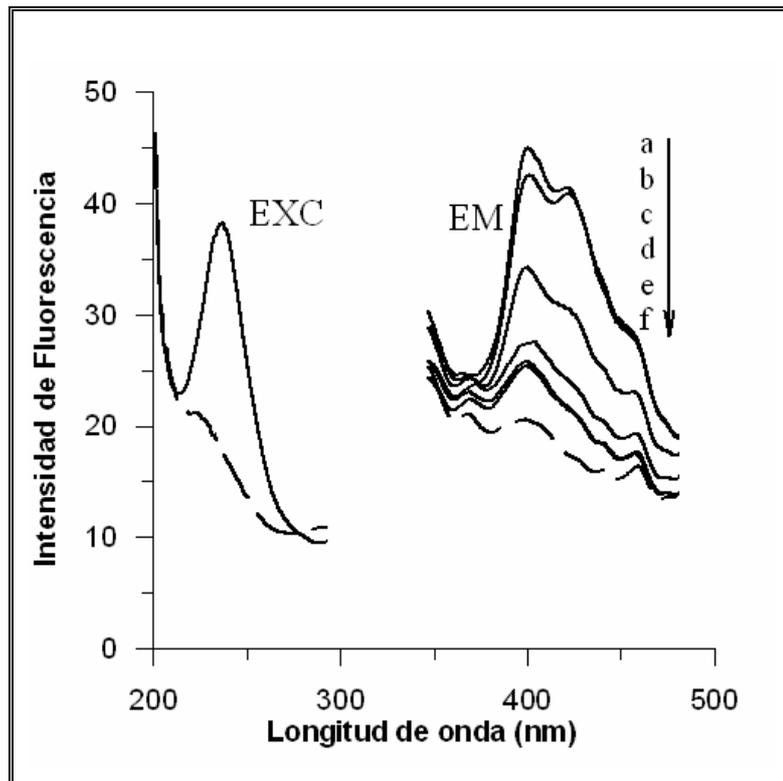


Figura VIII. 5.-Espectros de excitación y emisión del CBZ-EP en membrana de nylon, en ciclohexano (a), hexano (b), agua (c), metanol (d), benceno(e) y tolueno (f). $\lambda_{ex} = 256 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 430 \text{ nm}$. $V=310 \text{ nm}$.

3. Determinación simultánea de carbamacepina y carbamacepina-10,11-epóxido

Una vez establecidas las propiedades fluorescentes de ambos analitos fijados sobre la superficie de nylon, el siguiente objetivo es la determinación simultánea de ambos compuestos.

Para ello, se diseñó una matriz de calibración constituida por un total de 11 patrones de mezclas binarias. Estos patrones se prepararon a partir de disoluciones madre de CBZ y CBZ-EP en metanol. En matraces de 1.00 mL se adicionaron diferentes volúmenes de estas disoluciones madre, se evaporó empleando una corriente de nitrógeno y, finalmente, las muestras se diluyeron con hexano hasta enrase. Se eligió este disolvente, ya que, según indicamos anteriormente, es en este disolvente donde la carbamacepina presenta mayor fluorescencia.

Dado que existe un cierto grado de solapamiento espectral entre ambos compuestos, es necesario aplicar métodos de análisis multivariante para su determinación simultánea.

Nueve de estas muestras corresponden a la concentración dada por un diseño factorial, a tres niveles. Este diseño se describe como 3^k , donde 3 indica el número de niveles, y k el número de componentes. Las dos restantes corresponden muestras individuales de cada componente a niveles medios de concentración. En la siguiente tabla se muestran las concentraciones.

Tabla VIII. 1.- Concentración de los patrones que constituyen el conjunto de calibración.

Muestra	[Carbamacepina] ($\mu\text{g/mL}$)	[Epóxido de CBZ] ($\mu\text{g/mL}$)
1	2.244	2.300
2	4.488	2.300
3	6.732	2.300
4	2.244	4.600
5	4.488	4.600
6	6.732	4.600
7	2.244	6.900
8	4.488	6.900
9	6.732	6.900
10	4.488	0.000
11	0.000	4.600

Los intervalos de excitación y emisión fueron de 240-310 nm, con un incremento de λ de 5 nm, y de 370-470 nm con un incremento de λ de 1 nm., respectivamente. Es decir, el número total de puntos fue de 3636.

Se seleccionó el número óptimo de factores mediante el análisis de la consistencia de núcleo (Core Consistency) para PARAFAC y SWALTD, y mediante el criterio de Haaland y Thomas²⁰, para N-PLS y PLS-1. En todos los casos fueron empleados un total de dos factores.

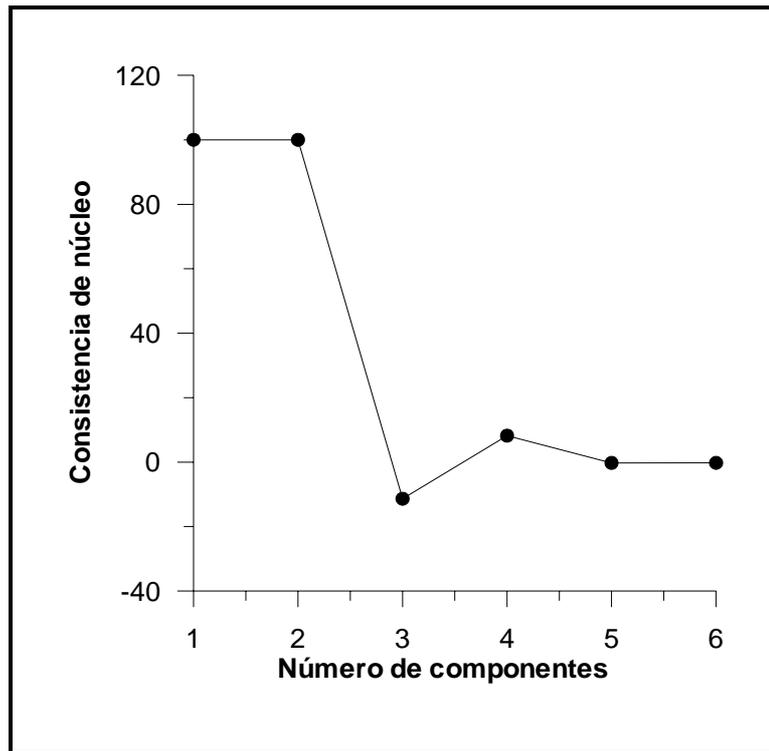


Figura VIII. 6.-Representación del *core consistency* en función del número de componentes para la determinación de carbamacepina y su epóxido mediante PARAFAC y SWALTD

En la siguiente figura (Figura VIII.7) se representa el espectro tridimensional para la mezcla de carbamacepina y su epóxido en hexano, una vez fijada en membrana de nylon.

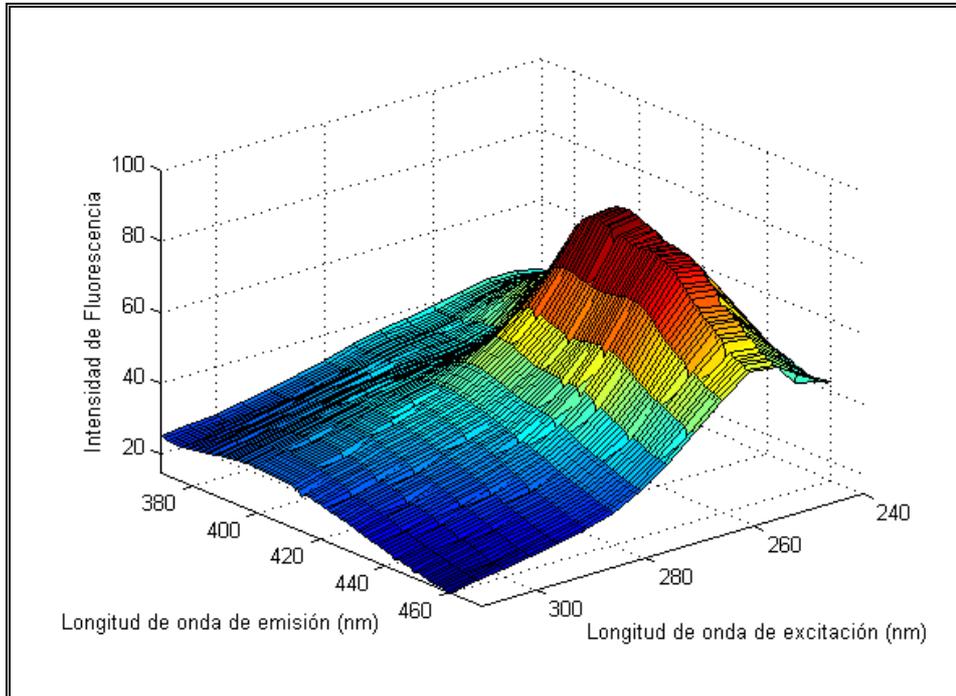


Figura VIII. 7.- Espectro tridimensional de carbamacepina y 10,11-epóxido, sobre membrana de nylon. [Carba] = 6.73 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y [CBZ-EP] = 4.60 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Podemos comparar los espectros de excitación y emisión calculados al llevar a cabo la descomposición matemática, con los obtenidos experimentalmente. En la siguiente figura se muestran estos espectros, comprobando que los experimentales y calculados son coincidentes.

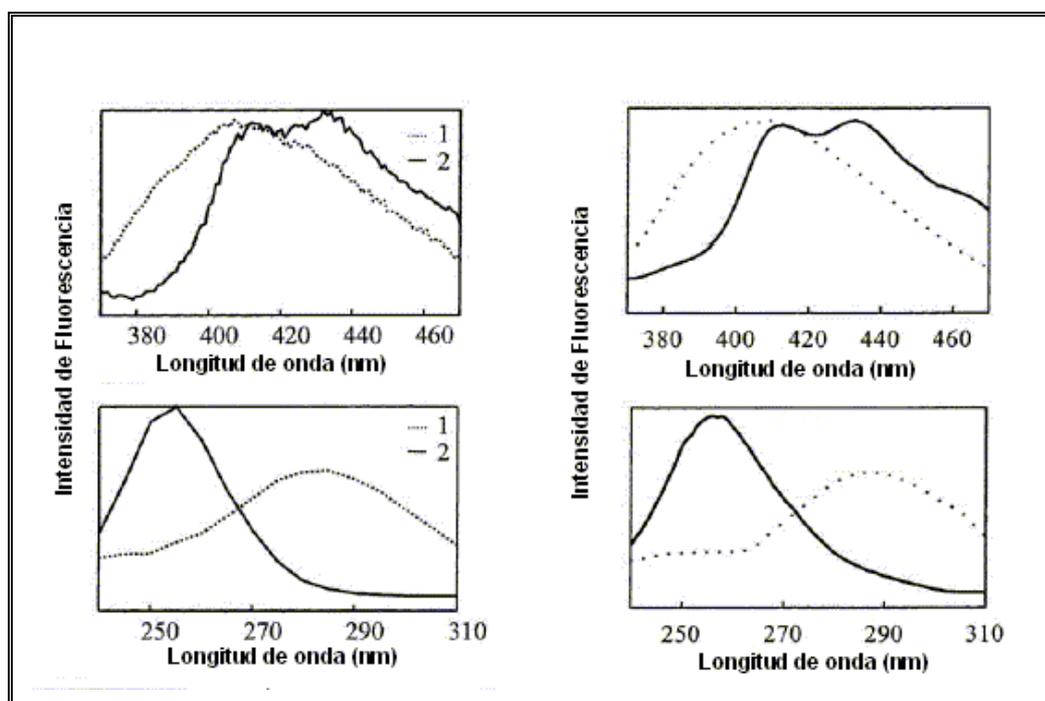


Figura VIII. 8.- Espectros de excitación y emisión para la carbamacepina (1) y su expósito (2), calculados (izquierda) y experimentales (derecha).

Para validar el método, se prepararon un total de diez muestras, de concentraciones diferentes a las empleadas en la calibración. Estas muestras se prepararon de forma idéntica a los patrones de calibración. En la Tabla VIII. 2, se recogen los valores de concentraciones (expresados como $\mu\text{g/mL}$) calculados por los diferentes métodos, así como los valores de recuperación para cada uno de ellos.

Tabla VIII. 2.- Determinación de CBZ y CBZ-EP mediante análisis de datos de segundo y tercer orden, para el conjunto de muestras de validación.

	C _T	Datos 2º orden		Datos de 3º orden					
		PLS-1		PARAFAC		SWATLD		N-PLS	
		C _c ^a	R (%)						
CBZ	1.99	2.04(7)	102	1.9(1)	95	2.0(1)	101	2.2(1)	108
CBZ-EP	6.50	6.28(4)	97	6.56(6)	101	6.57(5)	101	6.49(7)	100
CBZ	2.65	2.64(6)	100	2.7(1)	102	2.79(8)	105	2.6(1)	100
CBZ-EP	3.90	3.50(3)	90	3.87(5)	99	3.88(4)	99	3.82(6)	98
CBZ	6.12	6.26(7)	102	5.97(9)	98	5.97(8)	98	5.9(1)	97
CBZ-EP	6.10	5.60(4)	92	5.53(5)	91	5.52(5)	90	5.40(7)	89
CBZ	5.30	5.15(7)	97	5.3(1)	100	5.23(8)	99	5.4(1)	102
CBZ-EP	2.60	3.14(3)	121	2.96(5)	114	2.95(5)	113	3.02(5)	116
CBZ	6.63	4.99(7)	75	7.7(1)	116	7.7(1)	116	7.7(1)	116
CBZ-EP	1.95	2.43(4)	125	2.11(6)	108	2.12(5)	109	2.11(6)	108
CBZ	1.84	1.4(2)	76	2.07(8)	112	2.07(7)	112	2.18(8)	118
CBZ-EP	5.70	6.0(2)	105	6.65(7)	117	6.65(6)	116	6.48(9)	114
CBZ	5.76	5.8(2)	101	5.72(8)	99	5.72(7)	99	5.85(9)	102
CBZ-EP	1.82	2.0(2)	110	1.70(7)	93	1.69(6)	93	1.90(8)	104
CBZ	3.46	3.6(1)	104	3.59(8)	104	3.60(6)	104	3.54(7)	102
CBZ-EP	3.42	3.1(2)	91	3.44(6)	101	3.41(5)	100	3.29(7)	96
CBZ	1.38	1.5(2)	109	1.5(1)	109	1.54(8)	112	1.63(9)	118
CBZ-EP	3.42	3.4(1)	99	3.74(6)	109	3.76(5)	110	3.58(7)	105
CBZ	2.02	1.8 (5)	89	2.2(1)	109	2.21(8)	109	2.1(1)	104
CBZ-EP	2.04	1.76(5)	86	2.26(6)	111	2.31(5)	113	2.16(7)	106
CBZ Recuperación media ^b		95 ± 9		104 ± 5		105 ± 5		107 ± 6	
CBZ-EP Recuperación media ^b		102 ± 10		104 ± 6		104 ± 7		104 ± 6	

(a) Los valores de desviación estándar aparecen entre paréntesis

(b) Valores expresados en porcentaje. El intervalo de confianza se calculó según $C = t \cdot S / N^{1/2}$

Observamos como todos los métodos proporcionan resultados satisfactorios y muy similares. En cualquier caso, con PLS-1 se obtiene una ligera mayor dispersión en los resultados.

Análisis en muestras de suero humano enriquecido.

Para el análisis de muestras de suero, se prepararon un total de 10 muestras, contaminando suero humano tanto con CBZ como con su epóxido. Las concentraciones finales variaban de forma aleatoria entre 1 y 12.5 µg/mL. Los valores terapéuticos²⁴ de estos compuestos oscilan entre 4 y 12 µg/mL.

Es necesario llevar a cabo un proceso de extracción previo a partir del suero. Dicho proceso fue ensayado empleando diversos disolventes. Desafortunadamente, con hexano, que sería el disolvente más apropiado ya que es el disolvente que se emplea en el proceso de fijación de la muestra sobre el nylon, no se consiguen buenas recuperaciones. Sin embargo, empleando una mezcla de benceno y 1-pentanol (60:40) se obtienen recuperaciones aceptables. De modo que el procedimiento establecido para la separación desde el suero fue adicionar a 100 µL de suero enriquecido con los dos compuestos en estudio, 100 µL de la mezcla benceno: 1-pentanol, agitar vigorosamente durante 5 minutos, y posteriormente centrifugar (5 minutos a 2000 x g).

Una alícuota de 50 µL de la fase orgánica así obtenida se transfiere a un matraz, donde se evapora el disolvente mediante el paso de una corriente de nitrógeno. El sustrato sólido se disuelve entonces con 100 µL de hexano, de modo que la concentración final de CBZ y CBZ-EP se encuentren dentro de los intervalos lineales de concentración. Este proceso tan solo requiere unos minutos, y nos aseguramos de que nuestros analitos se encuentran en hexano.

Cada muestra de suero se preparó por triplicado. En estas condiciones se registran los correspondientes espectros de EEFM y se analizan con los diferentes métodos multivariantes de segundo orden. Cuando se aplica PLS-1, se emplea el mismo conjunto de muestras, usando como señal solo los espectros bidimensionales de emisión.

²⁴ He, J.; Shibukawa, A.; Nakagawa, T.; *Journal Pharmaceutical and Biomedical Analysis*; 10, 289, 1992

En la Tabla VIII. 3 se resumen los resultados de las muestras de suero enriquecido preparadas según el procedimiento descrito. Todas las concentraciones aparecen expresadas en $\mu\text{g/mL}$. Los valores de desviación estándar se expresan entre paréntesis. (C_t = concentración teórica, C_p = concentración predicha).

En la Tabla VIII. 4 se muestran los parámetros estadísticos calculados para estas predicciones.

De acuerdo con los resultados mostrados, los valores de recuperación y los parámetros estadísticos son satisfactorios, especialmente cuando se aplican PARAFAC y SWALTD. Mientras que las calibraciones de segundo orden PARAFAC y SWALTD tienen en cuenta los efectos de los constituyentes no presentes en los patrones de calibración, N-PLS y PLS-1 son especialmente sensibles a compuestos presentes en el extracto de suero y que pueden producir emisión de fluorescencia en las condiciones de trabajo.

Debido a la posible afinidad de la membrana de nylon a otras moléculas que contengan grupos NH, se pueden observar interferencias de moléculas que contengan dichas agrupaciones. Por ejemplo, moléculas tales como aminoácidos pueden, en principio, ser uno de los causantes de dichas interferencias. De los aminoácidos presentes en el suero, tan solo triptofano y tirosina muestran una emisión fluorescente notable²⁵.

De acuerdo a los resultados mostrados, ambos aminoácidos pueden emitir fluorescencia una vez fijados en la membrana de nylon. Si en el proceso de extracción, estos aminoácidos no son completamente separados con el disolvente orgánico, es posible que produzcan interferencias al aplicar la metodología PLS-1.

²⁵ Ichinose, N.; Schwedt, G.; Schnepel, F.M.; Adachi, K.; *Fluorimetric Analysis in Biomedical Chemistry*, in: J.D. Winefordner, I.M. Koithoff (Eds.), Wiley, N.Y. 1987

Tabla VIII. 3.- Resultados de recuperación en el análisis de muestras de suero enriquecidas.

		Datos de 1º orden		Datos de 2º orden					
		PLS-1		PARAFAC		SWATLD		N-PLS	
	Ct	Cp	R (%)	Cp	R (%)	Cp	R (%)	Cp	R (%)
CBZ	3.84	3.4(9)	89	3.4(2)	89	3.2(2)	83	5.0(2)	130
CBZ-EP	1.58	1.4(2)	89	1.7(1)	108	1.7(1)	108	1.8(1)	114
CBZ	12.1	13.4(2)	111	12.1(1)	100	11.8(2)	98	12.4(2)	102
CBZ-EP	9.00	10.1(1)	112	9.6(1)	107	9.92(8)	110	9.6(1)	107
CBZ	9.00	8.8(6)	98	9.2(1)	102	8.9(1)	99	9.0(2)	100
CBZ-EP	11.9	11.4(1)	96	10.7(1)	90	10.8(1)	91	10.5(1)	88
CBZ	12.5	10.8(4)	86	13.4(2)	107	12.3(1)	98	13.4(2)	107
CBZ-EP	12.4	12.7(1)	102	13.1(1)	106	13.4(1)	108	12.9(1)	104
CBZ	12.5	10.1(1)	81	11.9(2)	95	11.7(1)	94	12.4(2)	99
CBZ-EP	6.22	8.12(6)	131	5.2(1)	84	5.2(1)	84	5.2(2)	84
CBZ	9.80	9.1(1)	93	11.0(2)	112	10.9(2)	111	11.2(2)	114
CBZ-EP	6.00	8.56(6)	143	5.9(1)	98	5.9(1)	98	6.0(2)	100
CBZ	6.52	5.9(1)	90	6.9(2)	106	6.7(1)	103	7.1(2)	109
CBZ-EP	9.70	9.78(6)	101	8.9(1)	92	8.90(8)	92	8.9(1)	92
CBZ	12.5	11(1)	88	11.9(1)	95	11.3(2)	90	12.8(2)	102
CBZ-EP	3.10	2.36(6)	76	3.1(1)	100	2.0(1)	65	3.1(1)	100
CBZ	3.14	2.2(1)	70	3.0(2)	96	3.1(1)	99	3.2(2)	102
CBZ-EP	12.4	15.8(1)	127	10.9(1)	88	10.9(1)	88	10.6(1)	85
CBZ	3.40	4.2(8)	124	3.5(1)	103	3.2(2)	94	6.2(2)	182
CBZ-EP	3.36	4.62(8)	138	3.3(1)	98	3.4(1)	101	3.2(1)	95

Tabla VIII. 4.- Resultados estadísticos de la determinación simultánea de CBZ y CBZ-EP en suero mediante calibración de primer y segundo orden

	PLS-1			PARAFAC			SWATLD			N-PLS		
	RMSEP ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	REP (%)	R^2	RMSEP ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	REP (%)	R^2	RMSEP ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	REP (%)	R^2	RMSEP ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	REP (%)	R^2
CBZ	1.3	15	0.893	0.61	7.1	0.976	0.66	7.7	0.973	1.2	14	0.913
CBZ-EP	1.7	22	0.830	0.83	11	0.958	0.95	12	0.945	0.92	12	0.949

$$\text{RMSEP (root mean square errors of prediction)} = \left[\frac{1}{I-1} \sum_1^I (c_t - c_p)^2 \right]^{1/2} \text{ donde } I$$

es el número de muestras de predicción, c_t y c_p son las concentraciones teóricas y predichas, respectivamente.

$$\text{REP (relative error of prediction)} = \frac{100}{\bar{c}} \times \text{RMSEP} \text{ donde } \bar{c} \text{ es la concentración media de dicho componente.}$$

$$R^2 \text{ (coeficiente de determinación)} = 1 - \frac{\sum_1^I (c_t - c_p)^2}{\sum_1^I (c_t - \bar{c})^2}$$

Para obtener mayor información sobre la capacidad predictiva de los métodos empleados, se ha realizado una regresión entre la concentración nominal y predicha por los diferentes métodos. El valor del intervalo de confianza para la ordenada y pendiente obtenidos en dicha regresión para cada método se han comparado con los valores (0,1) teóricos mediante el denominado test de la elipse (EJCR, *Elliptical Joint Confidence Region*)²⁶.

Como podemos observar en la Figura VIII. 8, todas la elipses contienen el punto teórico (0,1). Sin embargo, las correspondientes a N-PLS y PLS-1 muestran un mayor tamaño; esto nos indica que estos dos últimos algoritmos producen resultados más dispersos, por lo tanto menos precisos, siendo PARAFAC el que aparentemente arroja los mejores resultados.

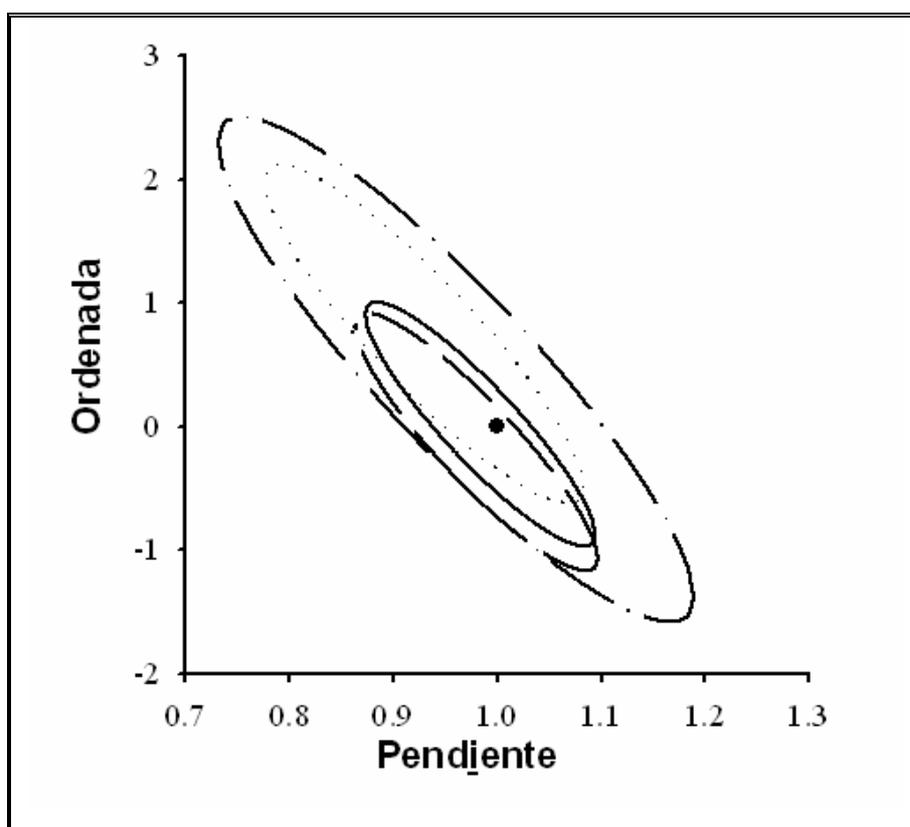


Figura VIII. 9.- EJCR para las regresiones de las predicciones de CBZ y CBZ-EP, aplicando PARAFAC (—), SWALTD (----), N-PLS (....) y PLS-1 (-.-.)

²⁶ González, A.G.; Herrador, M.A.; Asuero, A.G.; *Talanta*, 48, 729, 1999

Finalmente, y con objeto de evaluar el método propuesto con muestras reales, se analizó suero procedentes de paciente tratados con carbamacepina. Los valores obtenidos son estadísticamente comparables, al aplicar el correspondiente test t, con los proporcionados por métodos de referencia. El método de referencia aplicado ha sido FPIA (*Polarization Immunoanalysis*)^{27,28} para la carbamacepina, y un método cromatográfico^{29,30} para la determinación de su epóxido. El primero de los métodos se realizó en el laboratorio del Hospital Provincial de Santa Fe (Argentina).

En la siguiente tabla se muestran los resultados obtenidos en los sueros de pacientes al aplicar el método de referencia, y los que proponemos en este trabajo.

Tabla VIII. 5.- Resultado de los análisis a sueros de pacientes^a.

Suero		Método de Referencia ^b	Datos 2º orden	Datos de 3º orden		
			PLS-1	PARAFAC	SWATLD	N-PLS
I	CBZ	8.73	8.6(5)	7.8(1)	5.2(1)	8.0(1)
	CBZ-EP	1.60	1.4(1)	1.70(7)	1.36(6)	1.86(7)
II	CBZ	7.23	6.8(5)	6.0(1)	5.4(1)	7.2(1)
	CBZ-EP	1.36	1.4(1)	1.42(7)	1.46(7)	1.56(7)
III	CBZ	5.88	6.0(5)	5.9(1)	5.7(1)	7.0(1)
	CBZ-EP	1.12	0.8(1)	1.18(7)	1.32(7)	1.42(8)

^a Valores expresados en µg/mL

^b FPIA para CBZ y HPLC para CBZ-EP

Estos resultados nos indican que la presencia tanto de sustancias endógenas como exógenas, no causan grandes interferencias a los métodos propuestos en este capítulo.

²⁷ Lensmeyer, G.L.; Gidal, B.E.; Wiebe, D.A.; *Therapeutics Drug Monitoring* 19, 292, 1992

²⁸ Bonato, P.S.; Lanchote, V.L.; De Carvalho, D.; Ache, P.; *Journal Analytical Toxicology* 16, 88, 1997

²⁹ Dasgupta, A.; Vega, A.E.; Wells, A.; Datta, P.; *Therapeutics Drug Monitoring* 21, 421, 1999

³⁰ Ashy, A.R.; El Sabet, Y.M.; Islam, S.I.; *Journal Pharmaceutical Pharmacology* 38, 572, 1986

4. Determinación de Carbamacepina en preparados farmacéuticos.

Podemos determinar de forma sencilla carbamacepina en preparados farmacéuticos aplicando la metodología descrita en este capítulo y calibración univariante. Por lo tanto, se procedió a la construcción de la correspondiente recta de calibrado. En la tabla VIII.6 se resumen los parámetros estadísticos de la calibración.

Tabla VIII. 6.- Parámetros de la regresión lineal para la carbamacepina^a

Parámetro	
Rango lineal ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	1.2 – 7.0
Coficiente de regresión	0.996
Ordenada	19.3 (0.1)
Pendiente	1.96 (0.04)
γ^b ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	5.3
L.O.D ^c ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	0.4
L.O.Q ^d ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	1.2

^a La curva de calibrado se construyó utilizando 7 patrones preparados por triplicado. ($N = 21$).

^b Sensibilidad Analítica: $\gamma = m / S_s$, donde S_s es la desviación estándar de los residuos de la regresión.

^c Límite de detección según criterio de Clayton.

^d Límite de cuantificación según $3 \times \text{L.O.D}$.

Los fármacos analizados, son los que aparecen en la siguiente tabla. Los resultados que se muestran nos indican que el método propuesto conduce a resultados satisfactorios. La ausencia de interferencias, por parte de los excipientes, puede comprobarse al evaluar los buenos resultados de recuperaciones.

Tabla VIII. 7.- Determinación de CBZ en preparados farmacéticos

Preparado	Composición	CBZ predicha ^a
Carbamazepina– Denver Farma (tableta)	Carbamacepina 200 mg, excipientes.	201 (8) mg [101 %]
Tegretol–Novartis (tableta)	Carbamacepina 200 mg, excipientes.	208 (1) mg [104 %]
Tegretol–Novartis (Jarabe)	Carbamacepina 2.00 g/100 ml, excipientes.	2.03 (0.05) mg/100 ml [102 %]

^a Media de tres determinaciones individuales. Entre paréntesis aparecen los valores de desviación estándar y entre corchetes los de recuperación.

Los valores de recuperación se han calculado suponiendo que los preparados contienen la cantidad indicada por los laboratorios.

5. Conclusiones

En este capítulo se ha propuesto un método sencillo para la determinación de carbamacepina basado en la emisión fluorescente que presenta este compuesto, cuando se deposita sobre una membrana de nylon.

Se ha determinado carbamacepina, en suero humano, junto con uno de sus principales metabolitos, cabamacepina 10,11-epóxido.

Si comparamos los métodos quimométricos empleados, podemos concluir que los mejores resultados se obtienen cuando se utilizan métodos de segundo orden; y dentro de estos tanto con PARAFAC como con SWATLD, nos proporcionan la misma precisión en los resultados.

También se ha determinado carbamacepina de forma individual en fármacos, utilizando calibración univariante. Se han obtenido resultados satisfactorios en los casos investigados.

Las técnicas que se proponen en este capítulo, constituyen una buena alternativa a los procedimientos cromatográficos empleados, con el consecuente ahorro de disolventes. La utilización de membranas de nylon presenta las ventajas de su fácil adquisición y que no requieren ningún pretratamiento.

APENDICES

Apéndice A.

ACOC

Análisis por calibración de orden cero

1. Introducción

En gran parte de los estudios analíticos, existe la necesidad de establecer una regresión lineal entre una señal instrumental y una variable química controlada. Existen un gran número de trabajos experimentales, que pueden ser modelados mediante la utilización de una regresión lineal. El gran desarrollo computacional ha permitido la elaboración de mecanismos que pueden simplificar de forma importante los cálculos estadísticos. El gran avance de la quimiometría es debido, en parte, a la mayor facilidad que existe para el manejo de un gran número de datos, la realización de cálculos y el desarrollo computacional. Existe un amplio número de programas informáticos de química analítica a diferentes niveles de complejidad y coste. Por ejemplo, las actuales calculadoras de bolsillo, pueden realizar gran parte de los cálculos estadísticos necesarios. Sin embargo, a la hora de calcular un parámetro analítico específico, ya sea sensibilidad analítica, límite de detección, precisión de un método, etc., es necesario el empleo de un programa muy específico. En ocasiones, este tipo de programas son, o bien inaccesibles o extremadamente costosos. Este aspecto puede resolverse si se posee la capacidad de elaborar el propio programa.

Actualmente, la programación en entorno MATLAB¹ está teniendo un gran auge dentro de la química analítica y, concretamente, dentro del campo de la quimiometría. El nombre MATLAB proviene de la contracción *matrix laboratory*. Este paquete de software presenta gran poder computacional, gráfico y de programación, todo ello en un lenguaje sencillo, lo que hace que la programación en MATLAB sea fácil de llevar a cabo. MATLAB es un sistema interactivo, donde el elemento básico es el vector, el cual no requiere una dimensionalización previa. Esto permite la resolución de un gran número de problemas computacionales, especialmente aquellos basados en el cálculo matricial y vectorial.

¹ MATLAB 5.3; The MathWorks Inc.: Natick, MA.; 1999

2. Teoría

La utilización de la regresión lineal no ponderada para el establecimiento de la curva de calibración lineal, conlleva la aceptación de tres premisas²:

- Los errores deben ser debidos únicamente a las señales instrumentales.
- Los errores deben estar distribuidos de acuerdo a una distribución normal.
- Los errores absolutos de la señal instrumental deben ser constantes e independientes de la concentración de las disoluciones patrones (homocedasticidad).

La forma habitual de construir una calibración lineal es la siguiente: Se prepara un conjunto de disoluciones patrón. En este conjunto de muestras, la concentración del analito debe ser conocida. Este grupo de muestras constituye el conjunto de patrones de calibración, las cuales serán medidas con el correspondiente equipo instrumental bajo las mismas condiciones. Por cada patrón se tendrá una determinada señal analítica. El siguiente paso será acoplar estos resultados a una ecuación lineal (1):

$$y = a + bx \quad (1)$$

donde y es la señal analítica, x es la concentración, y a y b son la ordenada y pendiente de la línea de regresión. Esta relación se realiza empleando el modelo estadístico de regresión lineal mínimos cuadrados. El modelo estadístico busca el mejor ajuste lineal entre los datos experimentales y la concentración, además proporciona una medida de la imprecisión de los cálculos. En la literatura se pueden encontrar las correspondientes ecuaciones, desviaciones estándar de la regresión, pendiente y ordenada en el origen. Todos los cálculos son sencillos, pero se requiere bastante tiempo para llevarlos a cabo.

² Cuadros Rodríguez, L.; García Campaña, AM.; Jiménez Linares, C; Roman Ceba, M. *Analytical Letters*, 26, 1243, 1993

La pendiente y ordenada en el origen se calculan de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$b = \frac{\sum_{i=1}^n [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})} \quad (2)$$

$$a = \bar{y} - b\bar{x} \quad (3)$$

donde y_i representa el valor de la señal instrumental obtenida para una concentración x_i de una disolución patrón, y \bar{x} e \bar{y} son los valores medios del set de concentración y señales empleadas en la calibración.

La desviación estándar de la regresión de y sobre x , $s_{y/x}$ se calcula de la siguiente forma:

$$s_{y/x} = \sqrt{\frac{1}{n-2} \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2} \quad (4)$$

donde \hat{y}_i es el valor de la señal calculada de ecuación de regresión correspondiente a una concentración x_i , y n es el número total de puntos utilizados en la construcción de la recta de calibración; $s_{y/x}$ es una medida de calidad del ajuste de los datos experimentales a una línea recta.

Las desviaciones estándar de la pendiente y la ordenada vienen dadas por :

$$s_b = s_{y/x} \sqrt{\frac{1}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} \quad (5)$$

$$s_a = s_{y/x} \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n x_i^2}{n \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} \quad (6)$$

En la etapa de predicción de una muestra problema, la expresión general para calcular la desviación estándar en la concentración viene dada por:

$$s_x = \frac{s_{y/x}}{b(1-g)} \sqrt{(1-g) \left(\frac{1}{m} + \frac{1}{n} \right) + \frac{(y - \bar{y})^2}{b^2 \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} \quad (7)$$

donde m es el número de repeticiones de análisis de la muestra problema, y es la media aritmética de los valores de señal obtenidos de los m análisis y g se calcula del siguiente modo:

$$g = t^2 \frac{s_{y/x}^2}{b^2 \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad t(0.05, n - 2) \quad (8)$$

En algunas ocasiones, el error global de los resultados proviene de una combinación de diferentes contribuciones, de las distintas etapas del análisis. A veces, este error global puede estar dominado por una o más etapas del análisis, donde el error aleatorio no es dependiente de la concentración. En estos casos, debemos esperar que los errores en la dirección y de la recta de calibrado sean iguales en todos los puntos (homocedasticidad) y, por tanto, la regresión puede ser no ponderada. En otros casos, los errores pueden ser aproximadamente proporcionales a la concentración de los patrones o, incluso, los errores en la dirección y pueden crecer al aumentar x , pero no tan rápidamente como la concentración. Ambos tipos de datos heterocedásticos pueden ser tratados mediante el empleo de regresión ponderada. Este tipo de regresión es más compleja que la no ponderada, y requiere más información.³⁻⁵

En la regresión ponderada se establece un factor de ponderación para cada punto, que es inversamente proporcional a la varianza correspondiente a ese punto:

$$w_i = \frac{1}{s_{yi}^2} \quad (9)$$

la pendiente, ordenada en el origen y el valor de la desviación estándar de y sobre x vienen dadas por:

$$b = \frac{\sum_{i=1}^n w_i (x_i - \bar{x}_w)(y_i - \bar{y}_w)}{\sum_{i=1}^n w_i (x_i - \bar{x}_w)^2} \quad (10)$$

$$a = \bar{y}_w - b\bar{x}_w \quad (11)$$

³ Miller N.J.; Miller J.C.; *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*. Prentice Hall, 4th Ed. England, 2000

⁴ Ramis Ramos, G., García Álvarez-Coque, M.C.; *Quimiometría*, Ed. Síntesis. 2001

⁵ Massart, D.L.; Vandeginste, B.G.M.; Buydens, L.M.C.; De Jong, S.; Lewi, P.J.; Smeyers-Verbeke, J.; *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A*. Elsevier, 1997

$$s_{(y/x)_w} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n w_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}} \quad (12)$$

donde $\bar{x}_w = \frac{\sum_{i=1}^n w_i x_i}{\sum_{i=1}^n w_i}$ e $\bar{y}_w = \frac{\sum_{i=1}^n w_i y_i}{\sum_{i=1}^n w_i}$

La desviación estándar de la regresión ponderada para la pendiente y la ordenada, se calculan:

$$s_{aw} = \sqrt{\frac{s_{(y/x)_w}^2 \sum_{i=1}^n w_i x_i^2}{\sum_{i=1}^n w_i \left(\sum_{i=1}^n w_i x_i^2 - \sum_{i=1}^n w_i \bar{x}_w^2 \right)}} \quad (13)$$

$$s_{bw} = \sqrt{\frac{s_{(y/x)_w}^2}{\sum_{i=1}^n w_i x_i^2 - \sum_{i=1}^n w_i \bar{x}_w^2}} \quad (14)$$

En la predicción de la muestra problema:

$$s_{xw} = \frac{s_{(y/x)_w}}{b} \sqrt{\left(\frac{1}{mw_o} + \frac{1}{n} + \frac{(y - \bar{y}_w)^2}{b^2 \left(\sum_{i=1}^n w_i y_i^2 - n\bar{x}_w^2 \right)} \right)} \quad (15)$$

donde y es la señal medida y w_o es el factor de ponderación.

Si se está empleando el método de las adiciones estándar, la desviación estándar, s_x , del valor extrapolado de x , no es como viene dada en (7), sino que se calcula del siguiente modo:

$$s_x = \frac{s_{y/x}}{b} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{\bar{y}^2}{b^2 \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} \quad (16)$$

Para expresar un resultado analítico, son necesarios un mayor número de parámetros estadísticos analíticos, a estos parámetros se los denomina figuras de mérito:

a) Para expresar linealidad: El coeficiente de determinación, r^2 :

$$r^2 = \left[\frac{\sum_{i=1}^n [(y_i - \bar{y})(x_i - \bar{x})]}{\sqrt{(y_i - \bar{y})^2 \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} \right]^2 \quad (17)$$

Valores de r^2 próximo a uno, no necesariamente implican una calidad elevada en los datos analíticos. En la literatura podemos encontrar una expresión alternativa de linealidad², como una relación entre la pendiente y la desviación estándar de la pendiente, es decir, la desviación estándar relativa de la pendiente expresada en %:

$$\text{linealidad}(\%) = \left(1 - \frac{s_b}{b} \right) \times 100 \quad (18)$$

- b) Sensibilidad analítica: Existen diferentes definiciones de sensibilidad de un método analítico. La IUPAC recomienda la relación entre la señal instrumental y la concentración del analito. Puede ser medida del análisis de regresión, como la relación entre el error de la regresión y la pendiente, expresada en unidades de concentración. La sensibilidad analítica establece la mínima diferencia en concentración, discernible en cualquier punto de la línea de calibración²:

$$\gamma^{-1} = \frac{s_{y/x}}{b} \quad (19)$$

- c) Límite de detección: En términos generales, el límite de detección de un método puede describirse como la concentración que origina una señal instrumental significativamente diferente de la señal del blanco o del fondo³. En los años setenta, la IUPAC⁶ establece como límite de detección como la concentración x_L , o cantidad, q_L , originada por la mínima señal medible y_L , donde $y_L = \bar{y}_{bL} + kS_{bL}$, siendo \bar{y}_{bL} la media de las señales correspondientes a los blancos, S_{bL} la desviación de las señales proporcionadas por el blanco y k una constante. El límite de detección se obtiene como $x_L = kS_{bL}/b$, siendo b la pendiente de la recta de calibración. La IUPAC recomienda la utilización de un valor de $k=3$.

⁶ Nomenclature, symbol, units and their usage in spectrochemical analysis II. Spectrochimica Acta part B, 33, 242, 1978

⁷ Long, G.L.; Winefordner, J.D.; Analytical Chemistry, 5, 743, 1957

⁸ Clayton, C.A.; Hines, J.W.; Elkins, P.D.; Analytical Chemistry. 59, 2506, 1987

El procedimiento de la IUPAC para el cálculo del límite de detección ha sido discutido por diferentes autores. Long y Winefordner⁷ en un trabajo crítico, proponen una modificación al método propuesto por la IUPAC consistente en la teoría de propagación de errores, teniendo en cuenta los errores en los valores de ordenada y pendiente:

$$x_L = 3 \times \frac{\sqrt{\left(s_{bL}^2 + s_a^2 + \left(\frac{a}{b} \right)^2 s_b^2 \right)}}{b} \quad (20)$$

Clayton y col.⁸ proponen en su trabajo que los métodos tradicionales para la determinación del límite de detección, están basados dando cabida únicamente a errores del tipo falso positivo. Una mejor aproximación, para definir el límite de detección, es cuando se tienen en cuenta tanto las probabilidades de falso positivo como las de falso negativo. Clayton propone la utilización del parámetro $\Delta(\alpha, \beta)$ en lugar de un valor $k=3$. Este factor depende de α , β y de los grados de libertad $(n-2)$, donde n es el número total de pares de datos utilizados en la construcción de la recta de calibrado, α y β se relacionan con las probabilidades de falso positivo y falso negativo. Una buena aproximación es cuando $\alpha=\beta=0.05$.

$$x_L = \Delta(\alpha, \beta) \frac{s_{yo}}{b} \quad (21)$$

donde s_{y_0} se obtiene extrapolando el valor de la desviación estándar a cero de concentración utilizando la desviación estándar en señal en ese punto, calculada del siguiente modo:

$$s_{y_0} = s_{y/x} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(-\bar{x})^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} \quad (22)$$

- d) Precisión: Este parámetro puede calcularse a partir de la desviación estándar relativa, la cual se obtiene dividiendo el valor de la desviación estándar de la concentración, para cada patrón, entre la concentración media. Normalmente se representa gráficamente en función de la concentración.

Generalmente, al realizar los procesos de ajuste, se asumen una serie de premisas, tales como la homocedasticidad en los errores. Para este propósito, una representación gráfica de los errores puede ser útil a la hora de determinar si existe una distribución aleatoria de los mismos. No obstante, se pueden emplear criterios estadísticos tales como el análisis de varianza (ANOVA). Este test puede utilizarse para determinar la falta de ajuste en una regresión, a la hora de verificar cual de los modelos elegidos es correcto. Será necesario disponer de réplicas. En este test una F calculada es comparada con el correspondiente valor tabulado:

$$F_{cal} = \frac{MS_{LOF}}{MS_{PE}} \quad (23)$$

donde MS_{PE} es una estimación de la varianza debida al error puro, y MS_{LOF} es una estimación de la varianza por falta de ajuste. En este test, el valor calculado de F se obtiene teniendo en cuenta $(k-2)$ y $(n-k)$ grados de libertad, donde k es el total de niveles de concentración y n es el número total de puntos experimentales. Si la relación entre el valor calculado y tabulado es significativa al nivel de significación propuesto, se concluye que el modelo es inadecuado ya que la variación del grupo de datos no puede ser explicada en términos de incertidumbre experimental. En ese caso, un examen del gráfico de residuos nos puede ayudar a establecer la adaptación del modelo. Si los valores de MS_{PE} y MS_{LOF} son comparables, el modelo está validado.

Los estudios correspondientes a la precisión pueden realizarse utilizando la región de confianza elíptica para la ordenada y la pendiente¹⁰, incluso este método puede ser utilizado para la comparación de recuperaciones de dos métodos diferentes¹¹.

La región de confianza toma una forma elíptica con centro (a,b) . La ecuación para un nivel de confianza del 95 % viene dada por:

$$(\alpha - a)^2 + 2\bar{x}(\alpha - a)(\beta - b) + \left(\frac{\sum_{i=1}^n x_i^2}{n} \right) (\beta - b)^2 = 2F_{\alpha; 2n-2} \frac{s_{y/x}^2}{n} \quad (24)$$

donde α y β son los verdaderos valores de ordenada en el origen y pendiente.

Para comparar las pendientes de dos rectas de calibrado (representadas como b_1 y b_2) se lleva a cabo mediante el uso del correspondiente test de la t :

$$t = \frac{b_1 - b_2}{\sqrt{s_{b_1}^2 + s_{b_2}^2}} \quad (25)$$

¹⁰ Mandel, J; Linning, F.J.; *Analytical Chemistry*, 5, 743, 1987

Si las varianzas de los residuos, σ^2_1 y σ^2_2 , estimadas a partir de $s^2_{y/x1}$ y $s^2_{y/x2}$, son iguales (comparación que se puede llevar a cabo mediante un test de la F), el valor de la varianza combinada puede calcularse como:

$$s_e^2 = \frac{(n_1 - 2)s_{y/x1}^2 + (n_2 - 2)s_{y/x2}^2}{n_1 + n_2 - 4} \quad (26)$$

De manera que el test se realiza calculando:

$$t = \frac{b_1 - b_2}{\sqrt{s_e^2 \left(\frac{1}{\sum_{i=1}^n (x_{i1} - \bar{x}_1)^2} + \frac{1}{\sum_{i=1}^n (x_{i2} - \bar{x}_2)^2} \right)}} \quad (27)$$

este valor de t se compara con el correspondiente tabulado con $n_1 + n_2 - 4$ grados de libertad al nivel de significación elegido.

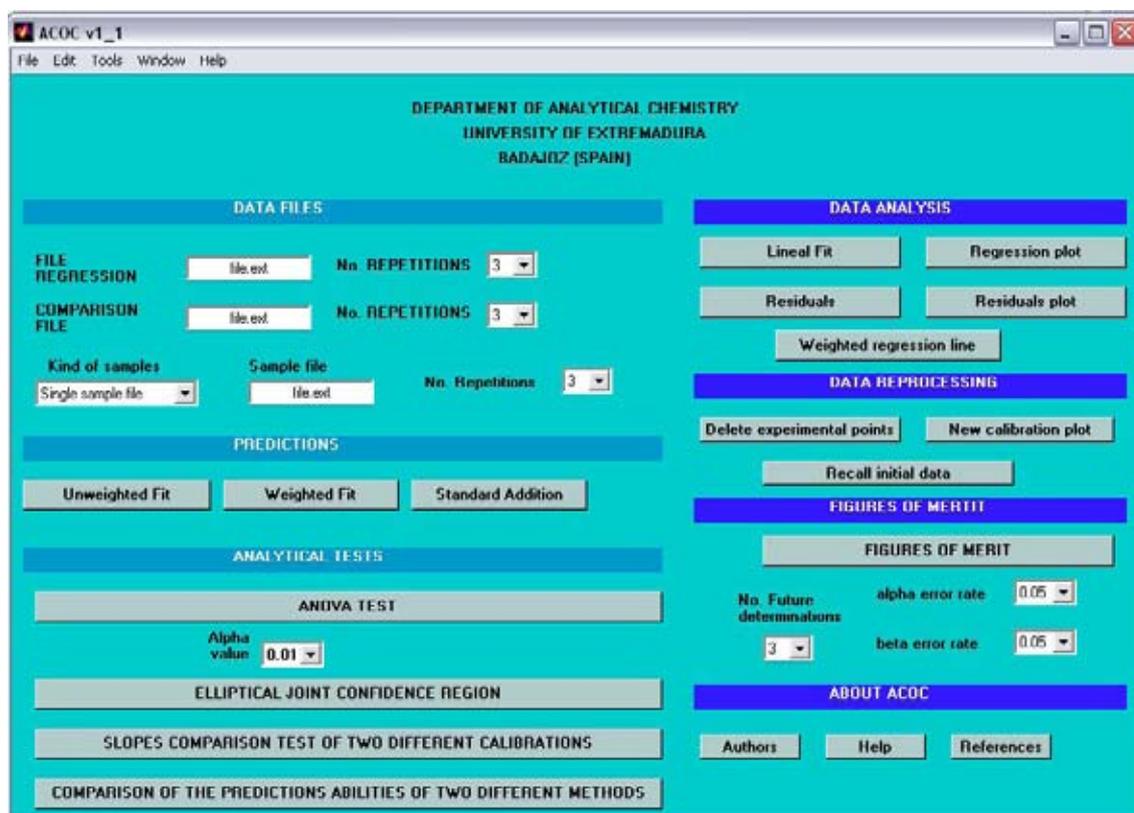
Si las varianzas residuales no son iguales, se puede utilizar una aproximación similar al test de Cochran para la comparación de dos medias con diferentes varianzas. Si $\sigma^2_1 \neq \sigma^2_2$, el valor teórico de t se selecciona de la correspondiente tabla. El valor calculado de t se hace del siguiente modo:

$$t = \frac{t_1 s_{b1}^2 + t_2 s_{b2}^2}{s_{b1}^2 + s_{b2}^2} \quad (28)$$

y el valor calculado de t obtenido de la ecuación (25) se compara con el calculado en la ecuación (28).

3. Software

La pantalla principal del programa se presenta en la siguiente figura:



Esta interfaz consta de seis partes:

Ficheros de datos: En esta parte se introducen los datos relativos a la recta de calibrado y el fichero de la recta de comparación. En esta parte también se introducen los datos relativos a la o las muestras problemas a determinar.

Análisis de datos: En esta segunda parte, se encuentran los comandos de acción de cálculo de los parámetros de la recta de calibrado no ponderada y ponderada, los residuos y gráficos de residuos.

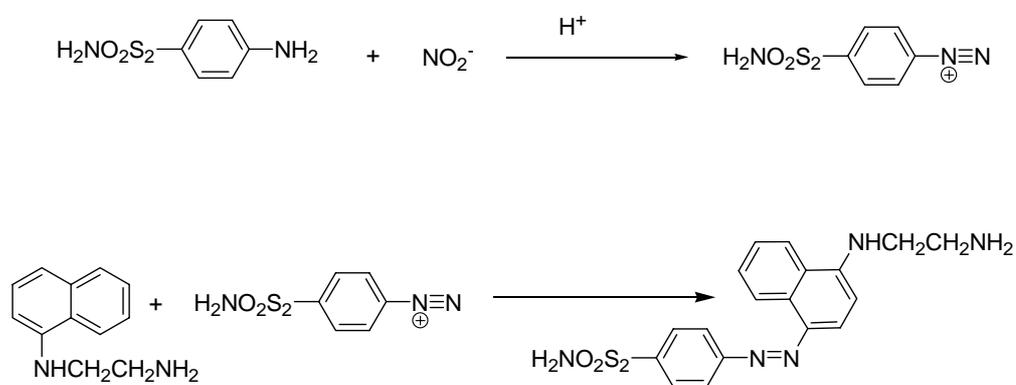
Predicciones: En esta sección del programa se calcula la concentración de la muestra problema, aplicando la regresión no ponderada, ponderada o adición estándar.

Figuras de Mérito: Las principales figuras de méritos pueden ser calculadas en esta sección. Linealidad, sensibilidad analítica y límites de detección, de acuerdo con los criterios de Clayton y Long-Winefordner. La curva de precisión se muestra en esta sección.

Test analíticos: Diferentes test analíticos se aplican en esta sección. Los correspondientes gráficos y datos se muestran al aplicar los diferentes botones de acción.

Ejemplo

Para explorar todas las ventajas del software escrito, vamos a exponer un experimento simple. Se trata de la determinación de nitritos en aguas mediante la reacción de Griess, utilizando Flow Injection Analysis con detección fotométrica⁴. Este método se basa en la reacción de sulfanilamida con los nitritos en medio ácido, para generar un diazocompuesto, que reacciona con una amina aromática para producir un compuesto coloreado, que absorbe a 540 nm.



El objetivo de este trabajo experimental, es la cuantificación de nitritos en un agua natural. La presencia de nitritos en agua es señal de contaminación. Los nitritos pueden causar diferentes problemas de salud en individuos sanos.

⁴ Giné, M.F.; Bergamin, H.; Zagatto, E.A.G.; Reis, B.F.; *Analytical Chimica Acta*, 144, 1980, 191

En la Tabla 1 se muestran los valores de absorbancia para un conjunto de patrones, que constituyen una calibración. Las disoluciones se midieron empleando dos equipos diferentes.

Tabla 1. Medidas de señales espectroscópicas usando dos detectores diferentes

NO ₂ ⁻ (µg/ml)	Absorbancia A	Absorbancia B
0.5	0.048	0.049
0.5	0.051	0.047
0.5	0.051	0.049
1.0	0.100	0.088
1.0	0.098	0.091
1.0	0.102	0.088
2.0	0.205	0.200
2.0	0.212	0.214
2.0	0.209	0.211
3.0	0.327	0.305
3.0	0.317	0.315
3.0	0.317	0.308
4.0	0.453	0.419
4.0	0.454	0.423
4.0	0.428	0.430

Se han preparado un total de cinco niveles de concentración, y de cada uno de ellos, se han realizado tres réplicas; teniendo un total de 15 puntos experimentales.

Para aplicar el programa, es necesario crear un fichero en formato ASCII, en el que los datos estén en dos columnas, cada columna separada entre sí por un espacio. Se empleará el punto, para diferenciar la parte entera de la parte decimal. Estos ficheros de datos se pueden generar utilizando el comando *edit* en MATLAB.

Una vez que tenemos los datos en el fichero, de forma apropiada, podemos comenzar los cálculos:

- Regresión lineal: El nombre del fichero con su extensión, debe escribirse en el hueco apropiado. Como de cada patrón se han realizado tres réplicas, hay que seleccionar el número 3 en la casilla apropiada. En estas condiciones, presionando sobre el botón Lineal Fit, el resultado del ajuste se muestra en el escritorio de MATLAB. Podemos obtener el gráfico del ajuste al ejecutar el comando Regression Plot.

Tabla 2. Parámetros de regresión para el método A

Linear Regression Results					
b	a	Sb	Sa	Sy/X	r2
0.1126	-0.0116	0.0017	0.0042	0.0084	0.9985

Tabla 3. Parámetros de regresión para el método B

Linear Regression Results					
b	a	S _b	S _a	S _{y/x}	r ²
0.1083	-0.0116	0.0014	0.0034	0.0068	0.9989

donde:

b: pendiente de la recta de calibrado

a: ordenada de la recta de calibrado

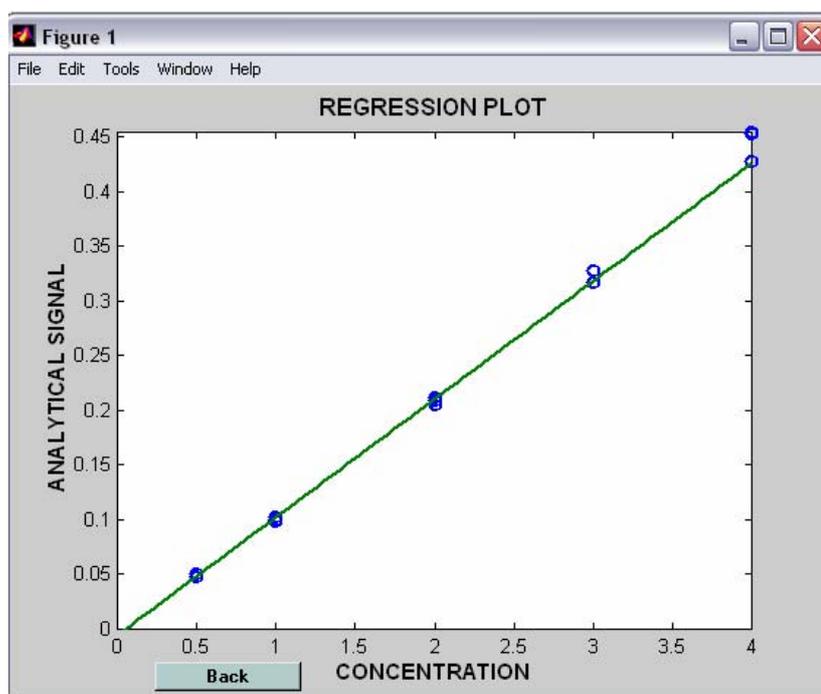
S_{y/x}: desviación estándar de regresión de y sobre x

S_b: desviación estándar de la pendiente

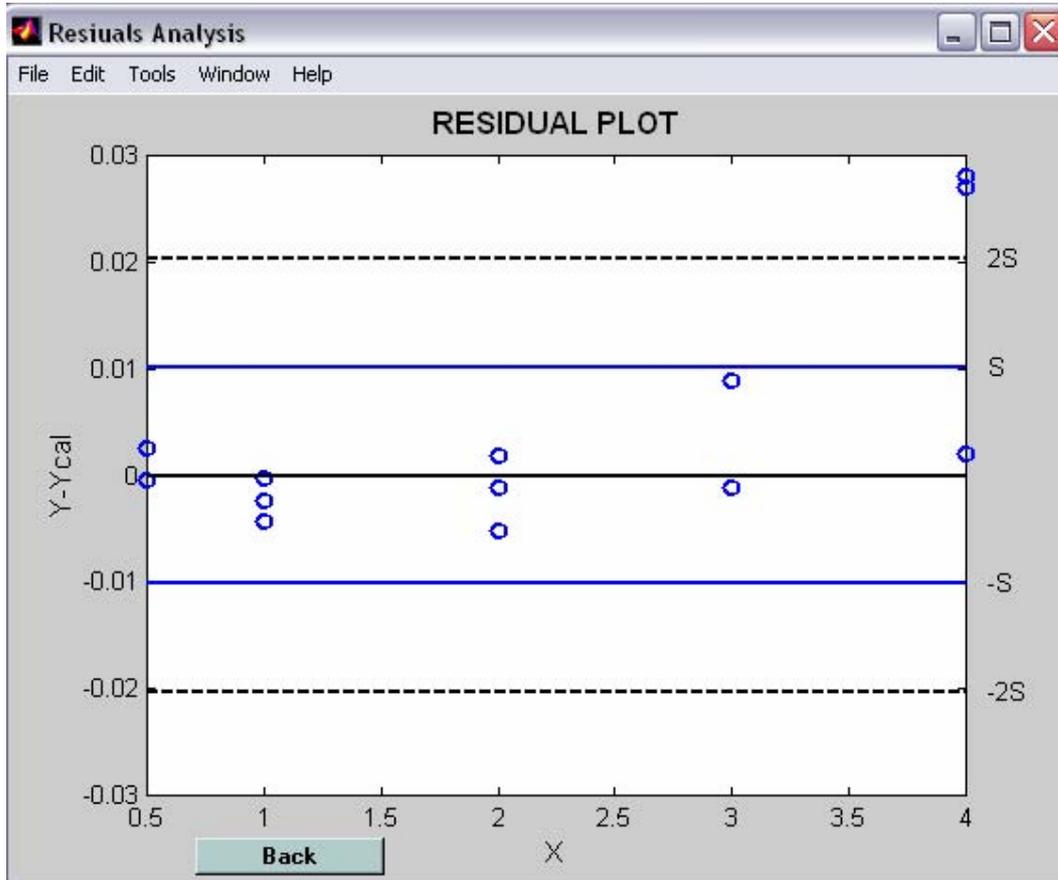
S_a: desviación estándar de la ordenada

*r*²: coeficiente de determinación

El programa nos permite visualizar los puntos experimentales, y la línea recta que mejor se ajusta a esos puntos.



Podemos hacer un análisis más extenso de los datos, estudiando sus residuos. Esto se puede haciendo un análisis tanto numérico como gráfico. En la opción Residuals Plot, podemos ver un gráfico de residuos.



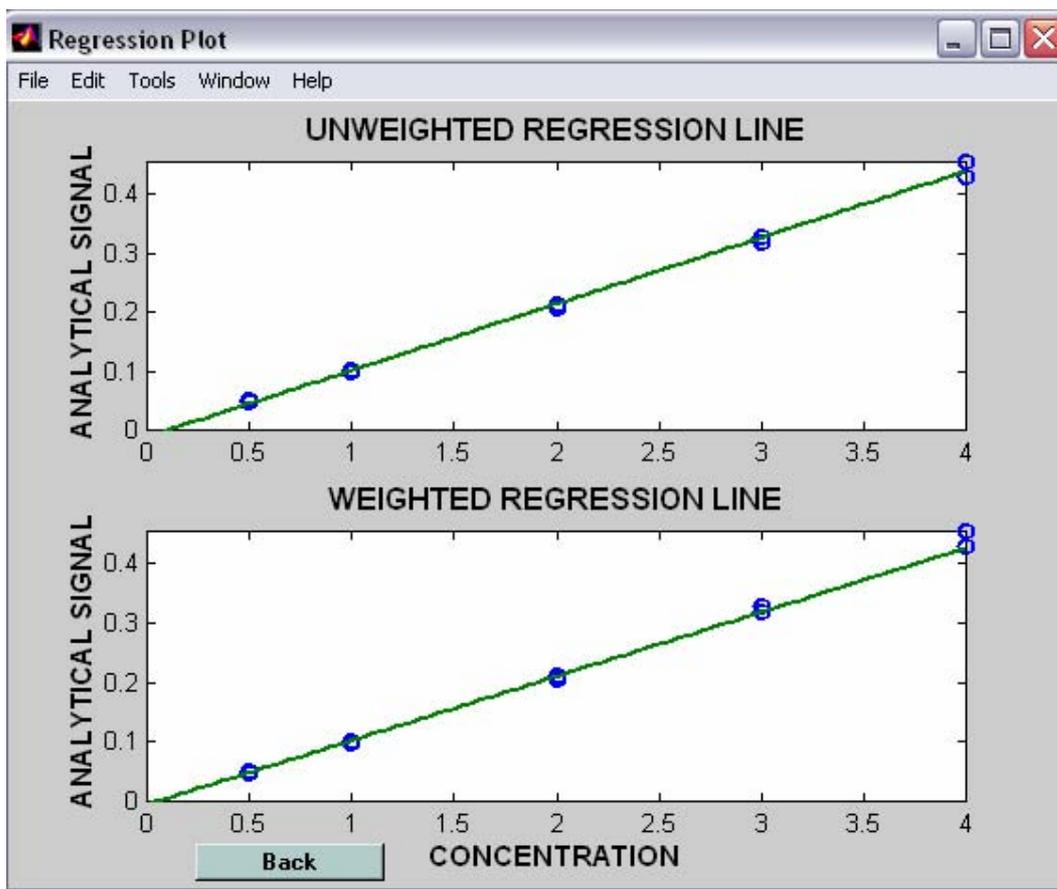
En este gráfico, podemos ver los residuos en señal, de los datos. Puede ser útil a la hora de detectar puntos discrepantes, pudiendo eliminar puntos experimentales en la opción de Delete experimental points.

Con la regresión lineal ponderada, el problema de la heterocedasticidad se soslaya introduciendo factores de ponderación inversamente proporcional a la varianza. De este modo, los puntos que presentan mayor precisión, son los que se tienen más en cuenta en el ajuste.

ACOC permite realizar este tipo de regresión, y la presenta del siguiente modo:

```
*****  
WEIGHTED RESULTS  
*****  
  
b      a      Sb      Sa      Sy/X  
-----  
0.1079  -0.0056  0.0000  0.0000  0.0112
```

También podemos comparar la regresión no ponderada con la regresión ponderada, de forma gráfica:



El cálculo de las figuras de mérito se puede realizar de forma sencilla, empleando este software. Tan sólo será necesario introducir el número de futuras determinaciones, y los errores para los cálculos del límite de detección de acuerdo al criterio de Clayton.

Para calcular la precisión, es necesario introducir el valor de la t de Student, para un nivel de confianza de $1-\alpha$, con $n-2$ grados de libertad. El software contiene un fichero con los valores de t , a diferentes niveles de confianza.

FIGURES OF MERIT

Linearity (%)

98.4946

Analytical Sensitivity (gamma-1)

0.0747

***** Detection limits *****

Long-Winefordner

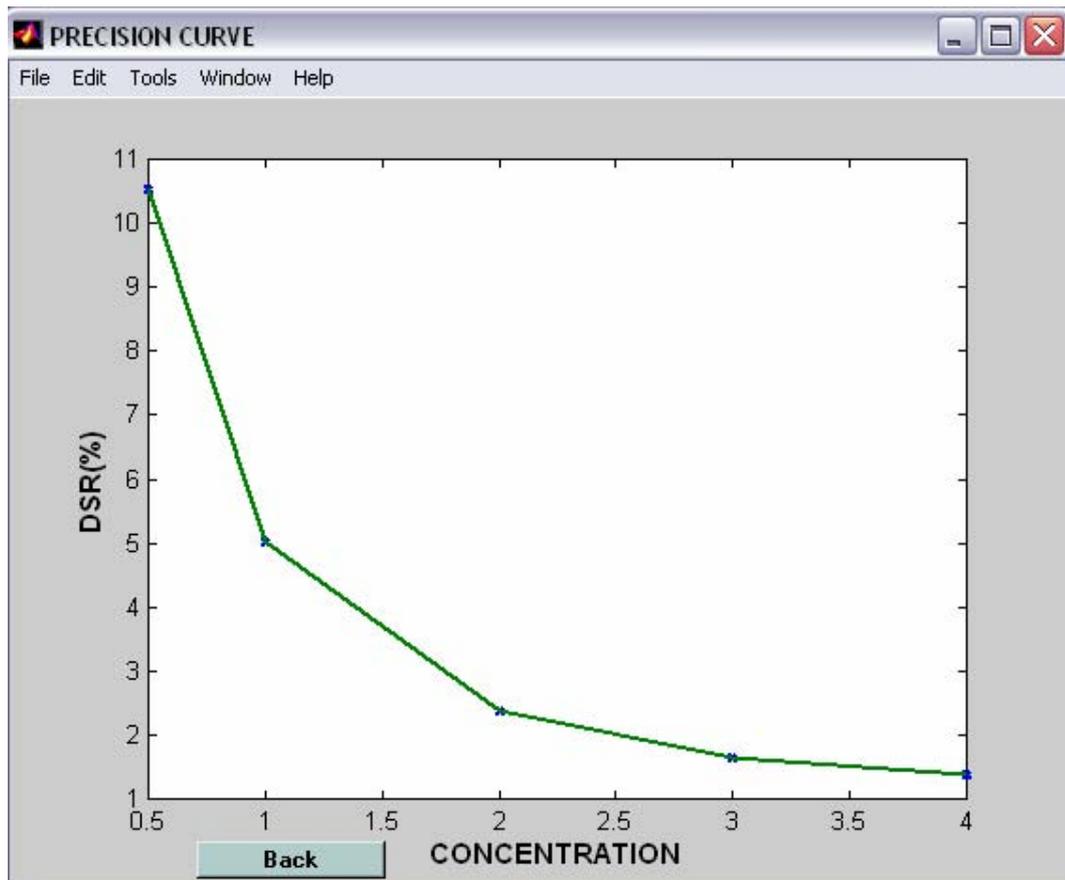
=====

0.1112

Clayton

=====

0.1977



Ajuste de los puntos experimentales, a un modelo lineal

Finalmente, el software contiene cuatro diferentes test analíticos: el test ANOVA puede detectar la falta de ajuste en la regresión, a la hora de determinar si el modelo elegido es el correcto. Para ello, es necesario medir réplicas para cada patrón.

El segundo test implementado, es el test de la región elíptica de confianza para la pendiente y la ordenada en el origen.

El tercero, compara las pendientes de dos rectas de calibrado.

Finalmente, el programa presenta la posibilidad de comparar métodos, utilizando las recuperaciones de ambos métodos, y la región de confianza elíptica.

Test ANOVA

ANOVA TEST RESULTS

DF(k-2)	DF(N-k)	MSLOF	MSPE	FCAL	FTAB
3.0000	10.0000	0.0001	0.0001	2.3408	3.7100

The model passes the ANOVA TEST for this significant level

Donde:

DF: Grados de libertad (k número de niveles de concentración y N número total de datos experimentales)

MSLOF: Residuos de falta de ajuste

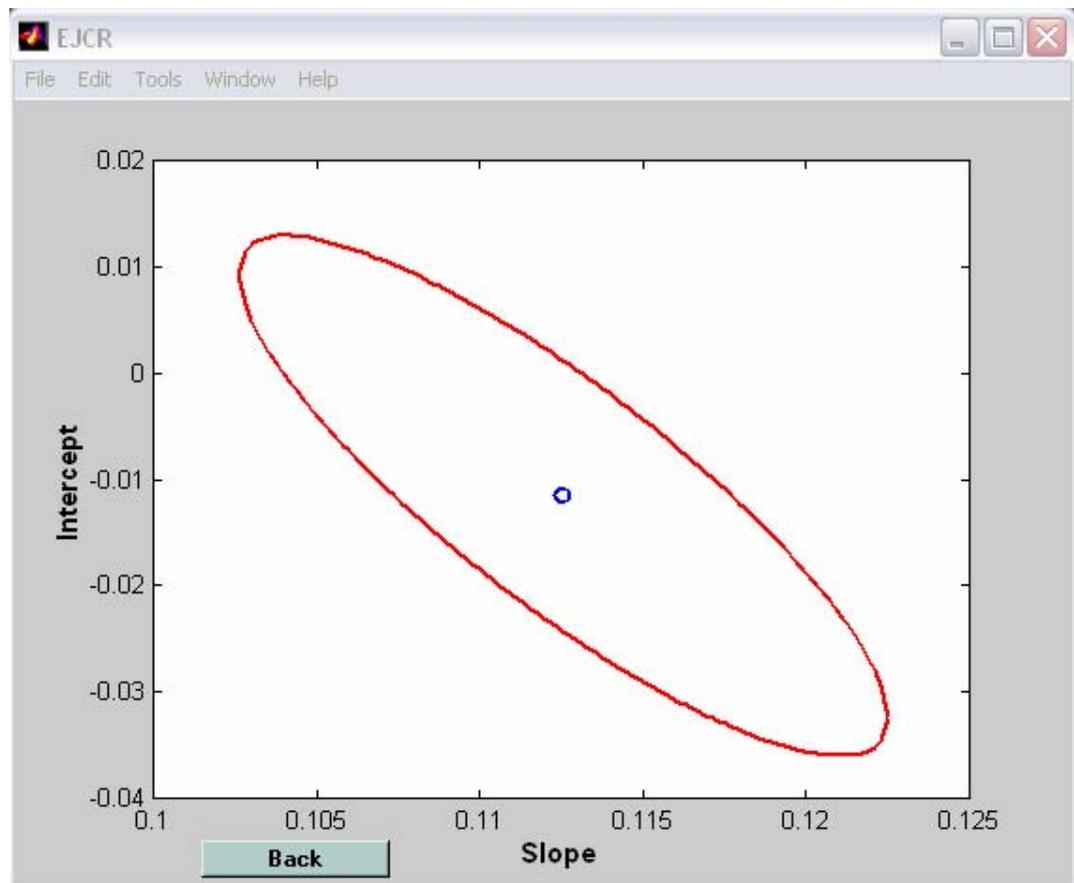
MSPE: Residuos de error puro

FCAL: Valor de F calculado

FTAB: Valor de F tabulado

Región de confianza elíptica:

Este test compara los valores de los intervalos de confianza de la pendiente y la ordenada en el origen, para el modelo establecido, y se representan gráficamente.



Test de comparación de pendientes de dos rectas de calibrado

Para realizar este test comparativo, el programa hace uso de un test de F y t. Es necesario introducir el nivel de significación que queremos aplicar. Una vez realizados los cálculos, se lanza un gráfico con ambas rectas

Alpha value for the F test :0.05
Alpha value for t test: 0.05

Fcal =
1.5100

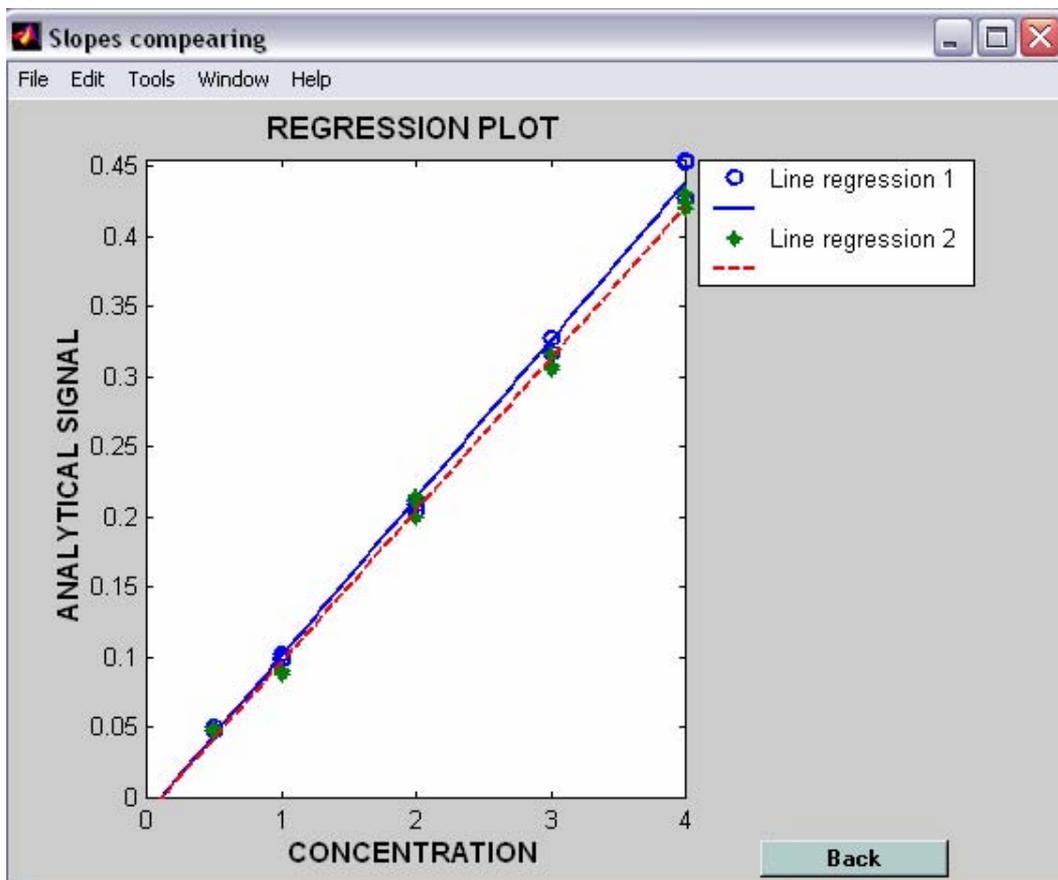
Ftab =
1.9600

The residual variances estimated by $S_{y/x1}$ and $S_{y/x2}$ are not statistically different

tcal =
1.9539

ttab =
2.0560

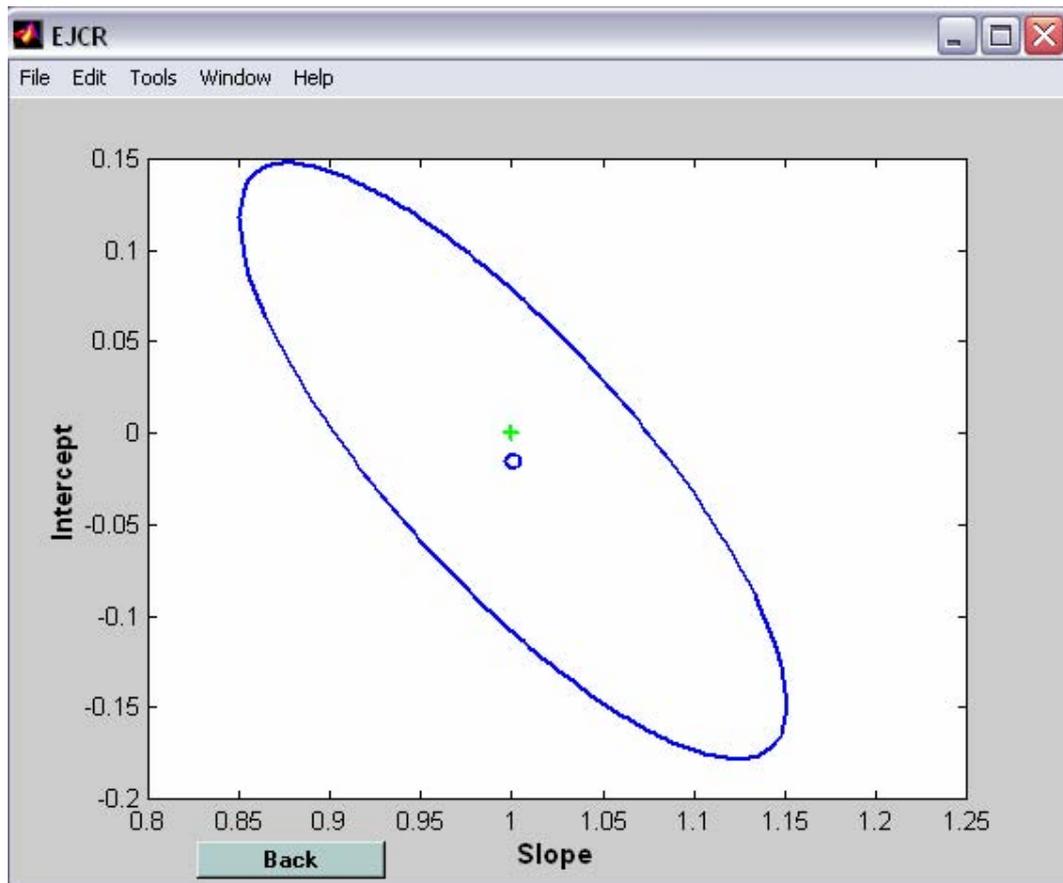
ttab > tcal the slopes of both curves are not statistically different at the chosen significance level



Test de comparación de dos métodos a través de las predicciones.

Si queremos comparar las predicciones obtenidas por dos métodos diferentes, podemos emplear este test. Por ejemplo, vamos a comparar dos set de calibración. En primer lugar, se calculan los valores de concentraciones predichas por ambos métodos, y seguidamente se calcula la regresión lineal que existe entre ellos. De forma ideal, deberíamos obtener una recta de pendiente 1 y ordenada 0.

```
» Write the response file of method one between apostrophes 'responsea.txt'  
Write the response file of method two between apostrophes 'responseb.txt'  
Number of repetitions 3
```



El cálculo de esta elipse, se ha realizado empleando mínimos cuadrados bi-variados⁵ (BLS). BLS es un nombre genérico para un conjunto de técnicas, que se emplean cuando existen errores en los dos ejes, es decir, tanto en x como en y. Este tipo de regresión es apropiado para comparar los resultados de dos diferentes métodos, ya que en ambos ejes hay error.

Predicciones empleando las calibraciones:

ACOC permite calcular la concentración de una muestra desconocida. El programa está diseñado de forma tal, que permite realizar el cálculo en muestras individuales, como para un conjunto de muestras almacenadas en un fichero ASCII. Hay tres posibles formas de cálculo, que dependerá de la técnica empleada para la regresión: No ponderada, Ponderada y Adición de patrón.

a) Calibración no ponderada

```
Confidence level of t-Student: 0.05
*** ANALYSIS RESULTS ****

Concentration      +/- confidence limits
0.5470            0.1138
0.9912            0.1082
1.9567            0.1021
2.9488            0.1057
4.0564            0.1202
```

b) Calibración ponderada

⁵ González, A.G.; Herrador, M.A.; Asuero, A.G.; *Talanta*, 48, 729, 1999

Signal value of the unknown sample 0.4240
Variance of the measurements 0.001

Confidence level of t-Student: 0.05

*** ANALYSIS RESULTS ****

Concentration	+/- confidence limits
3.9816	0.0450

c) Adición de patrón

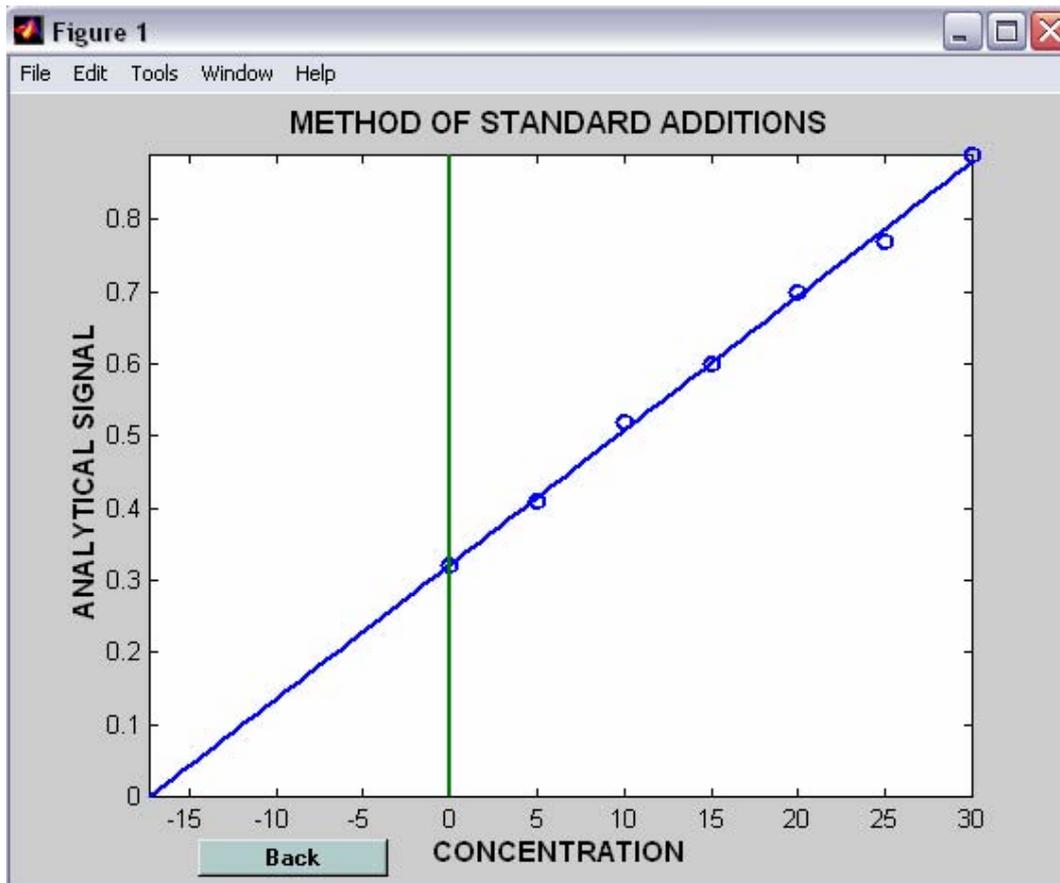
examplefile =

0	0.3200
5.0000	0.4100
10.0000	0.5200
15.0000	0.6000
20.0000	0.7000
25.0000	0.7700
30.0000	0.8900

>>
Confidence level of t-Student: 0.05

*** PREDICTION RESULTS ****

Concentration	+/- confidence limits
17.2605	1.9228



Apéndice B

ICLS

Interface classical least squares

1. Software

En este apartado será descrito el programa CLS. Este programa ha sido creado para la realización de calibración multivariada de primer orden mediante el método *Classical Least-Squares*. Nuevamente este programa ha sido escrito bajo el entorno MATLAB 5.3¹, de manera que para su funcionamiento es necesario disponer de este software.

La rutina que hace que este programa se ejecute se denomina **ICLS**². Al ejecutar esta rutina, surge la pantalla principal del programa. En ella habrá que indicar el nombre de los correspondientes ficheros; espectrales y de concentración. También hay que indicar si se dispone de espectros de disoluciones blanco y de espectros problemas.

¹ MATLAB 5.3; The Math Works Inc.: Natick, MA, 1999.

² González Gómez, D.; Muñoz de la Peña, A.; Espinosa Mansilla, A.; Olivieri, C.A.; *Chemical Educador*, 8, 187, 2003

El análisis CLS de una mezcla binaria es una extensión natural del problema clásico de determinación de la concentración de dos analitos mediante la medida de absorbancia de una muestra desconocida a dos longitudes de ondas diferentes. Es necesario conocer los valores de absorptividad molar a la longitud de onda dada. Una aproximación más general sería la utilización de la señal espectral completa. Este procedimiento supone dos etapas; la primera de calibración, donde todos los valores de absorptividad molar a cada longitud de onda son calculados para cada analito, y una segunda etapa de predicción, en la cual la concentración de los analitos se obtiene a partir del espectro completo de la muestra problema. La etapa de calibración se realiza utilizando un conjunto de mezclas binarias de concentración conocida de cada analito, en lugar de utilizar un conjunto de patrones individuales (MLR). De este modo, en CLS, las posibles interacciones que se puedan producir entre los analitos, pueden ser modeladas.

La primera figura que se obtiene al lanzar el programa son los espectros que constituyen el set de calibración.

En términos generales, el espectro de la mezcla I (vector de J absorbancias), entra a formar parte de la matriz \mathbf{R} de dimensiones $J \times I$. Las concentraciones de los K analitos forman un vector de dimensiones $K \times I$ formando la matriz \mathbf{C} , de manera que:

$$\mathbf{R} = \mathbf{S} \times \mathbf{C} \qquad \text{Ecuación 1}$$

donde la matriz \mathbf{S} de tamaño $J \times K$ contiene K columnas de J elementos, que corresponden a los valores de absorptividad molar para cada uno de los K analitos, a cada una de las J longitudes de onda.

El cálculo de la matriz **S** se realiza en dos etapas:

En primer lugar multiplicamos la ecuación 1 por la matriz traspuesta de C, resultando la ecuación 2.

$$\mathbf{R} \times \mathbf{C}^T = \mathbf{S} \times (\mathbf{C} \times \mathbf{C}^T) \quad \text{Ecuación 2}$$

y seguidamente multiplicamos ambos lados de la ecuación dos por $(\mathbf{C} \times \mathbf{C}^T)^{-1}$, resultando la ecuación número 3.

$$\mathbf{S} = \mathbf{R} \times \mathbf{C}^T \times (\mathbf{C} \times \mathbf{C}^T)^{-1} \quad \text{Ecuación 3}$$

La predicción mediante CLS conlleva el registro del espectro de la muestra problema a las J longitudes de onda utilizadas (\mathbf{r} , de dimensión $J \times 1$), siendo necesario que exista una linealidad entre el valor de la respuesta y la concentración de la muestra problema (vector de dimensiones $K \times 1$, \mathbf{c}).

$$\mathbf{r} = \mathbf{S} \times \mathbf{c} \quad \text{Ecuación 4}$$

La resolución de la ecuación 4 se lleva a cabo en dos etapas:

$$\mathbf{S}^T \times \mathbf{S} \times \mathbf{c} = \mathbf{S}^T \times \mathbf{r} \quad \text{Ecuación 5}$$

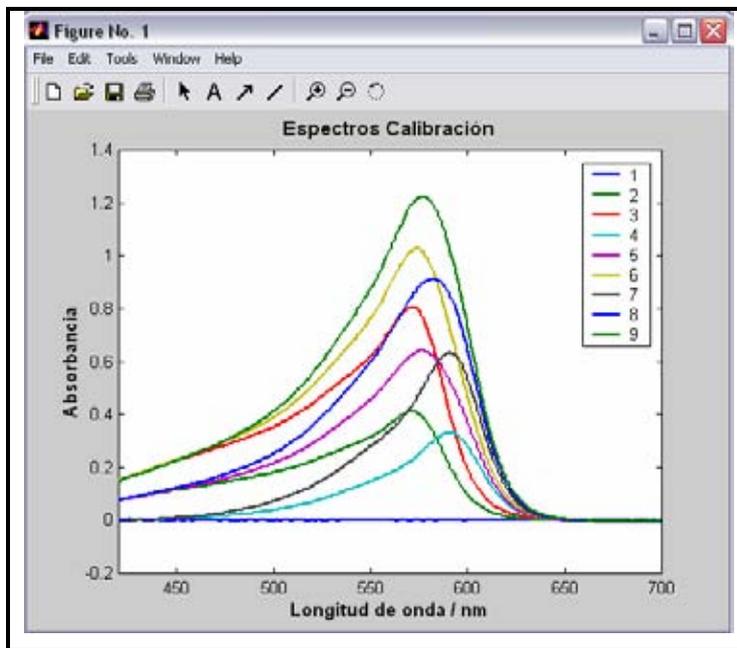
$$\mathbf{c} = (\mathbf{S}^T \times \mathbf{S})^{-1} \times \mathbf{S}^T \times \mathbf{r} \equiv \mathbf{S}^+ \times \mathbf{r} \quad \text{Ecuación 6}$$

donde \mathbf{S}^+ se conoce como la pseudo inversa de S. Las filas de esta matriz contienen los valores de los coeficientes de regresión, para un componente en particular (\mathbf{b}_k).

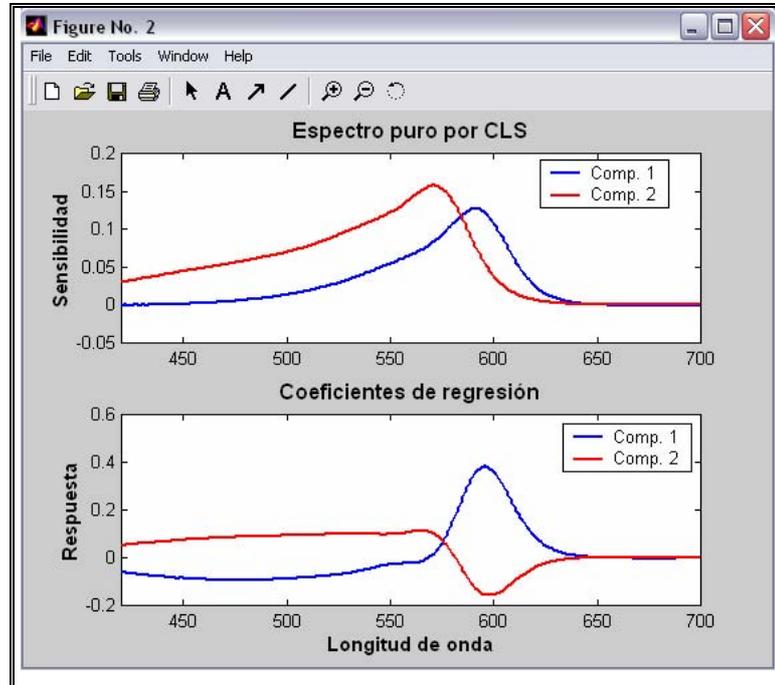
De manera que la concentración de cada analito en una muestra desconocida se hace de la siguiente forma:

$$c_k = b_k \times r \quad \text{Ecuación 7}$$

De manera que cuando se ejecuta el programa en primer lugar, se lanza la pantalla donde aparecen todos los patrones que constituyen el conjunto de calibración.



Seguidamente aplica los cálculos CLS, y se obtienen los espectros puros de cada componente, así como los coeficientes de regresión.



Y finalmente el programa nos lanza los valores de concentración para las muestras problemas introducidos, así como los errores asociados.

Component	Mean c	Exp. SD	Calc. SD
1.0000	2.0042	0.0015	0.0355
2.0000	1.9704	0.0064	0.0354
1.0000	1.0176	0.0054	0.0480
2.0000	0.9972	0.0073	0.0480
1.0000	4.0424	0.0025	0.0478
2.0000	3.9199	0.0032	0.0478

CONCLUSIONES

Conclusiones

1. Se han estudiado las propiedades de interés analítico de cinco fluoroquinolonas de segunda generación; enoxacino, norfloxacino, ofloxacino, ciprofloxacino y enrofloxacino, mediante técnicas fluorimétricas, estableciendo el efecto que ejercen las condiciones del medio, tales como naturaleza del disolvente, presencia de agentes oxidantes, tensioactivos, etc., en sus propiedades fluorescentes, así como el efecto de la irradiación UV. Se concluye que la mayor fluorescencia nativa se obtiene en agua y que la presencia de un agente micelar provoca un incremento importante en el rendimiento cuántico de fluorescencia. La irradiación UV origina fotorreacciones, en las que los fotoproductos generados son más fluorescentes que las fluoroquinolonas de partida.
2. Para la determinación de enoxacino, norfloxacino y ofloxacino en orina humana se ha empleado calibración multivariante de primer orden utilizando PLS. Se concluye que los mejores resultados se obtienen cuando, en los patrones que constituyen el conjunto de calibración, se encuentra presente la matriz compleja de orina en la dilución adecuada.
3. La determinación de estas tres fluoroquinolonas en medios más complejos, tales como el suero humano, se ha llevado a cabo mediante la aplicación de técnicas de calibración multivariante de segundo orden, aprovechando la denominada *ventaja de segundo orden*. Para ello, como señales, se emplean matrices de excitación-emisión fluorescente, y PARAFAC como técnica de calibración. Con el fin de incrementar la sensibilidad del método, se trabajó en un medio micelar.

4. Se han comparado diferentes técnicas de calibración multivariante, de primer y de segundo orden, tales como PLS-1, *N*-PLS, *unfolded*-PLS, PARAFAC y SWATLD, en la determinación de enoxacino, norfloxacino y ofloxacino en orina, empleando una etapa previa de fotorreacción. El uso de una reacción fotoquímica nos ha permitido incrementar la sensibilidad del método y la reducción de los límites de detección. Los mejores resultados se obtienen cuando empleamos señales de segundo orden, no observándose diferencias significativas entre la aplicación de SWATLD y PARAFAC, aunque es de destacar la mayor velocidad de cálculo observada con SWATLD.

5. Mediante la técnica cromatografía líquida de alta resolución se ha desarrollado un método para la determinación de norfloxacino, ofloxacino y enrofloxacino en presencia de enoxacino, tanto en suero plasmático como en orina humana, empleando modo isocrático y detección fluorescente de registro rápido. Se obtiene una aceptable resolución cromatográfica para los analitos estudiados. El método cromatográfico es sencillo y rápido.

6. La resolución cromatográfica de enoxacino, norfloxacino, ofloxacino y ciprofloxacino se ha realizado mediante el establecimiento de una metodología, que combina una reacción fotoquímica inicial con una etapa de separación cromatográfica. Se ha estudiado el tiempo de irradiación, de modo que la reacción fotoquímica sea completa. El método cromatográfico propuesto permite alcanzar los límites de detección de las fluoroquinolonas de interés en suero.

7. Se han estudiado las propiedades fluorescentes básicas de carbamacepina y su principal metabolito; carbamacepina 10,11 epóxido. Al soportar estos analitos sobre una membrana de nylon el rendimiento cuántico de fluorescencia para la carbamacepina aumenta, mientras que su epóxido, que no es fluorescente en disolución, pasa a exhibir fluorescencia. Se ha determinado de forma simultánea carbamacepina y su metabolito en suero plasmático, empleando técnicas de calibración multivariante de segundo orden (métodos PARAFAC y SWATLD). Los resultados han sido contrastados empleando técnicas de referencia en el análisis de suero procedente de diferentes pacientes tratados con carbamacepina.

8. Para el tratamiento estadístico de datos, se ha elaborado un programa informático que permite realizar calibración lineal. Con este programa se pueden realizar el cálculo de las figuras de mérito y diferentes test de comparación, de una forma sencilla y rápida. También se ha creado una rutina que permite hacer CLS. Ambos programas se han realizado bajo el entorno MATLAB.