

00524  
154



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

"PROPUESTA DE UNA METODOLOGIA ANALITICA PARA LA  
EXTRACCION Y DETERMINACION CUANTITATIVA POR  
CROMATOLOGRAFIA DE GASES CAPILAR DE ETOXIQUIN EN UNA  
MUESTRA DE USO VETERINARIO"

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA  
P R E S E N T A  
THALINA ALEJANDRA RODRIGUEZ FERNANDEZ



MEXICO, D. F.

EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUIMICA

2003

A



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**Jurado Asignado:**

**Presidente:** Prof. Santiago Capella Vizcaíno  
**Vocal:** Prof. Eduardo Guillermo Marambio Dennett  
**Secretario:** Prof. Víctor Manuel Ugalde Saldívar  
**1er Suplente:** Prof. Francisco Rojo Callejas  
**2do Suplente:** Prof. Araceli Patricia Peña Álvarez

**Sitio donde se desarrolló el tema:**

Laboratorio 101 del Departamento de Química Analítica DEPGs, Facultad de Química, UNAM.

**Asesor del tema:**

Santiago Capella Vizcaíno



**Supervisor Técnico:**

Reyna del Carmen Labastida Rubio



**Sustentante:**

Thalina Alejandra Rodríguez Fernández



*Dedicatorias:*

*A mi mamá,  
por que hasta ahora sus esfuerzos dan frutos.*

*A mi Abuellos Juanita y Tomás,  
por que esto fue el causante de no estar con ustedes antes de.....*

*A mi Abuelto Toño,  
por que me enseñaste como seguir tus pasos.....Gracias por cuidarme desde allá.*

*A mi Abue Chepa  
para que estés un poco orgullosa de mí.*

*A Erick  
por que sé que le hubiera gustado estar en mi lugar.*

*A mí  
por que me lo gané y estoy orgullosa de ello.*

## *Agradecimientos*

*VMUS....Ahora entiendo como estabas en esos momentos, sin embargo yo no podía dejar pasar la oportunidad para, si no agradecer, por lo menos hacer mención de tanta gente que de una u otra forma ayudo con un granito de arena a que esto llegara a su fin.*

*Primero este trabajo ¡y todo su trabajo! es gracias a mi madre, ya que sin su apoyo no hubiera logrado nada de lo que soy y hago. También a una persona que ha estado a mi lado en las buenas y en las no tan buenas....Polo ¡gracias por aguantarme tanto mi Amor!*

*A mi hermana, Papá, Tíos, Tías, Carnales, por haber creído siempre en mí. Abuelita ¡Ya terminé, pero no me voy a ir de aquí!. A mis primos Carlos, Mon y Kevin, por que me hacen recordar el verdadero valor de la infancia y que no debemos preocuparnos por muchas cosas: Mariana te quiero ver así un día.*

*A una persona muy especial, que sin estar presente siempre estuvo conmigo.....Tío Rafa, tus palabras (bueno letras) siempre fueron un impulso para seguir adelante.....Si Tío...Uno entre mil yo ganaré*

*A todos mis profesores.....no perdón a algunos nada más. Inocente, si no me hubiera retado tantas veces quizás no estuviera donde estoy. ¡Gracias por todo lo que me enseñó de la vida!*

*A una de las personas que hizo muy grata mi estancia por esta Universidad, mi "Prof Pilar Ortega, gracias por que me siento muy afortunada de haber sido adoptada por usted, no cabe duda que todavía hay personas que de verdad tienen un gran corazonzote ¡Mil.....no, diez millones de gracias a Dios por haberla conocido Prof!!!.....su niña.*

*A Carmen Cabastida: no quería poner lo mismo que todos los que pasan por ese laboratorio, pero creo que tenemos razón, siempre estas dispuesta a apoyarnos cuando se nos atora algo: yo en especial tengo que agradecer además de eso, tu amistad. ¡No se si hubiera aguantado tanto en otras circunstancias!*

*Victor Ugalde (Vic), por que me enseñaste con el ejemplo a ser persona, profesionalista, maestra, amiga, verdugo y ejecutor, pero lo mas importante....a ser UNIVERSITARIO, no tengo las palabras correctas para expresar todo, espero que esto baste.....Vic, te quiero muchísimo.*

*Amador, has sido mi confidente, cómplice, amigo de borracheras y hasta.....¿Tú crees que algo de esto hubiera cambiado si no me ganaras la apuesta? Gracias mil por ser como eres.*

*A Marambio, por que en los casos difíciles me ayudó a encontrar la mejor salida, por su amistad y apoyo desinteresado: aún más por demostrar se puede convivir a pesar de tener diferentes puntos de vista.*

A mis super. druper amigochos: Angélica que me veo con ella romando, yo café y ella Coca en cincuenta años. ¡Así de profunda es nuestra amistad! y Carlitos por que nos hemos unido mucho y.....no se me olvida me acompañaste hoy hasta las últimas. Por que a pesar de todo me apoyaban en mis locuras...gracias por que han demostrado lo que es la verdadera amiga'.

A las habitantes del cubículo de las niñas (Norma, Liz, Elsa y Güerlta) por que pasamos buenos, ricos, malos, peores, momentos, pero saben que?...todo eso nos hizo crecer. A mis otros cuates, Ale, Rodrigo, Yess, Patin y Chava por que me hacen sentir bien y querida. A mis compañeros de laboratorio, Andrecto, Jacqueline, Laura, Mario, Alejandra, Miguel, por hacer mas agradable mi estancia en ese laboratorio.

Erick, va por tí AMIGO, se que estarías contento y también se que TÚ lo hubieras logrado de la misma manera que yo. Gracias por acompañarme en esas noches de trabajo nocturno.

Todas esas personitas tan amables que se cruzaron alguna vez por mi camino y que sin esperar nada a cambio, me brindaron incondicionalmente su amistad y ayuda. Bery, Gaby, Karis, Emilio, Tabis, Fer, Pancho, Marú, Tania, Guillé, Cheltra, Iñiguez, Javier, Plintux, Gloco, Rodolf, Güerto y otras más que olvido mencionar o que no debo mencionar.

A los pozoleros de los viernes, por que disfrutábamos juntos una semana mas de trabajo. [Teóricos] que me dieron asilo y soportaron tanto tiempo, por que me demostraron que todos aquí somos iguales, que para exista respeto y cariño no es necesario ponernos títulos. Gracias por ser un Departamento diferente.

A la Dra Josefina de Gyves, por que me brindó su apoyo incondicional a pesar de no conocerme y de la situación.

A la Dra Araceli Peña, por que sus comentarios y sugerencias me hicieron ser más fuerte día con día.

A Santiago Capella por ser mi maestro en la carrera y tutor de mi proyecto de tesis, pero sobre todo por hacerme ver que cuando se quiere alcanzar un ideal, se tiene que luchar con todo para conseguirlo.

A la Universidad Autónoma de México por que me dio la oportunidad de realtzar uno de mis anhelos MI CARRERA, y a la Facultad de Química por que con esfuerzos crecí y maduré con ella.

Quiero terminar con una frase sabia de un amigo....." La ciencia, no se hace gracias a..... si no a pesar de....." Salud A, yo se lo que es eso.

Y por que soy Q.F.B.



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

F



	Página
Índice General	
INTRODUCCIÓN	1
Abreviaturas	3
Definiciones	5
CAPÍTULO I	
1.0 ANTECEDENTES	7
1.1 ANTIOXIDANTES	7
1.1.1 Generalidades	7
1.1.2 Antioxidantes en los alimentos	8
1.1.3 Clasificación de los antioxidantes	8
1.1.3.1 De acuerdo a su origen	8
1.1.3.1.1 Naturales o fisiológicos	8
1.1.3.1.2 Sintéticos	8
1.1.3.2 De acuerdo a su mecanismo de acción	9
1.1.3.2.1 Donadores de protones	9
1.1.3.2.2 Secuestradores de protones	9
1.1.3.2.3 Sinergistas	9
1.1.4 Regulación de los antioxidantes en productos alimenticios	9
1.2 ETOXIQUIN	11
1.2.1 Generalidades	11
1.2.2 Propiedades del etoxiquin	11
1.2.2.1 Propiedades Químicas	11
1.2.2.2 Propiedades Físicas	13
1.2.3 Usos del etoxiquin	14
1.2.4 Toxicología del etoxiquin	14
1.2.4.1 Tolerancia al etoxiquin	14
1.2.4.2 Toxicidad del etoxiquin	14
1.2.4.2.1 Toxicidad en humanos	14
1.2.4.2.2 Toxicidad en animales	15
1.2.5 Análisis de etoxiquin	15
1.3 EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO	16
1.3.1 Generalidades de la técnica	16
1.3.2 Fundamentos de la técnica	17
1.3.3 Ventajas y desventajas de la técnica	19
1.4 EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (EFS)	20
1.4.1 Generalidades de la técnica	20







	Página
1.4.2 Materiales de empaque para extracción en fase sólida	20
1.4.2.1 Fase normal	20
1.4.2.2 Fase reversa	21
1.4.2.3 Intercambio iónico	21
1.4.3 Análisis por Extracción en Fase Sólida	21
1.4.3.1 Modos de extracción en fase sólida	21
1.4.3.1.1 Retención de analitos de interés	21
1.4.3.1.2 Elución directa de analitos de interés	21
1.4.3.2 Procedimiento de extracción en fase sólida (EFS)	22
1.4.3.1.1 Acondicionamiento	22
1.4.3.1.2 Adición de muestra	22
1.4.3.1.3 Lavado	23
1.4.3.1.4 Elución	23
1.4.4 Ventajas y desventajas de la técnica	24
1.5 CROMATOGRAFÍA DE GASES CAPILAR (CGC)	24
1.5.1 Generalidades de la técnica	24
1.5.2 Fundamentos de la técnica	24
1.5.3 Equipo de Cromatografía de Gases Capilar	25
1.5.4 Ventajas y desventajas de la técnica	27
1.5.5 Cromatografía de Gases Capilar de Alta Temperatura (CGCAT)	27
1.5.6 Sistemas acoplados Cromatografía de Gases Capilar –Espectrometría de Masas (CGC-EM)	28
1.5.7 Análisis Cuantitativo	30
1.5.7.1 Método de calibración absoluta (Curva de calibración)	31
1.5.7.2 Método de estándar interno	31
1.5.7.3 Método de adiciones patrón	32

## CAPÍTULO 2

2.0 OBJETIVOS	33
2.1 OBJETIVO GENERAL	33
2.2 OBJETIVOS PARTICULARES	33

## CAPÍTULO 3

3.0 PARTE EXPERIMENTAL	35
3.1 REACTIVOS, EQUIPOS Y MATERIAL	35
3.1.1 Reactivos utilizados	35
3.1.1.1 Líquidos	35





	Página
3.1.1.2 Sólidos	36
3.1.1.3 Gases	37
3.1.1.4 Muestra Comercial de uso veterinario	37
3.1.2 Equipo	37
3.1.2.1 Mediciones por Cromatografía de Gases Capilar (CGC)	37
3.1.2.2 Mediciones por Espectrofotometría de Ultravioleta-visible	38
3.1.2.3 Mediciones Potenciométricas	38
3.1.3 Material	38
3.1.3.1 Material de laboratorio	38
3.1.3.2 Cartuchos para EFS	39
3.1.3.3 Columnas para CGC	39
3.2 CROMATOGRAFÍA DE GASES DE ALTA TEMPERATURA (CGCAT)	40
3.2.1 Determinación del programa de temperaturas	40
3.2.2 Cuantificación de etoxiquín por CGCAT	41
3.3 EXTRACCIÓN LÍQUIDO - LÍQUIDO (E.L-L)	42
3.3.1 Evaluación de técnicas de extracción por disolventes informadas en la literatura	43
3.3.1.1 Extracción líquido-líquido informada en <i>J. of the A.O.A.C.</i> , 1964	43
3.3.1.2 Extracción líquido-líquido informada en <i>J. of the A.O.A.C.</i> , 1966	43
3.3.1.3 Extracción líquido-líquido informada en <i>Agric. Food Chem.</i> , 1963	44
3.3.1.4 Extracción líquido-líquido informada en <i>Agric. Food Chem.</i> , 1963	44
3.3.2 Optimización de la técnica de extracción por disolventes de etoxiquín a partir de una muestra de uso veterinario	45
3.3.2.1 Modificación al proceso de extracción por disolventes	46
3.3.2.2 Efecto de la concentración de ácido clorhídrico sobre la extracción	46
3.3.2.3 Efecto del pH sobre la extracción	47
3.3.2.4 Efecto del disolvente sobre la extracción	47
3.3.3 Determinación de Parámetros de Calidad	48
3.3.3.1 Determinación de la linealidad	50
3.3.3.1.1 De la determinación cuantitativa por CGC	50
3.3.3.1.2 De la metodología analítica propuesta	50
3.3.3.2 Determinación del límite de detección	51
3.3.3.3 Determinación de la reproducibilidad	51
3.3.3.4 Determinación del porcentaje de recobro	52
3.3.4 Análisis de muestras	52
3.4 EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (EFS)	52
3.4.1 Evaluación de fase amino, $\text{NH}_2$ (fase normal)	54
3.4.1.1 Estimación de volúmenes de disolventes para el lavado y elución del cartucho	54





	Página
3.4.1.1.1 Análisis cuantitativo del etoxiquin presente en la muestra con los volúmenes de disolventes estimados	54
3.4.1.2 Evaluación de la polaridad de una mezcla de hexano y metanol para una separación eficiente de etoxiquin	55
3.4.2 Evaluación de fase octadecil, C <sub>18</sub> (fase inversa)	55
3.4.2.1 Estimación de volúmenes de disolventes para el lavado y elución del cartucho	56
3.4.2.1.1 Análisis cuantitativo del etoxiquin presente en la muestra con los volúmenes de disolventes estimados	56
3.4.3 Prueba preliminar con cartucho OASIS (fase inversa)	56

## CAPÍTULO 4

4.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	58
4.1 CROMATOGRAFÍA DE GASES DE ALTA TEMPERATURA (CAT)	58
4.1.1 Determinación del programa de temperaturas	58
4.1.2 Cuantificación de etoxiquin por CGCAT	60
4.2 EXTRACCIÓN LÍQUIDO - LÍQUIDO (E.L-L)	62
4.2.1 Evaluación de técnicas de extracción por disolventes informadas en la literatura	63
4.2.1.1 Extracción líquido-líquido informada en <i>J. of the A.O.A.C.</i> , 1964	63
4.2.1.2 Extracción líquido-líquido informada en <i>J. of the A.O.A.C.</i> , 1966	64
4.2.1.3 Extracción líquido-líquido informada en <i>Agric. Food Chem.</i> , 1963	65
4.2.1.4 Extracción líquido-líquido informada en <i>Agric. Food Chem.</i> , 1963	68
Propuesta de una metodología de extracción	73
OPTIMIZACIÓN DE METODOLOGÍA ANALÍTICA	73
4.2.2 Optimización de la técnica de extracción por disolventes de etoxiquin a partir de una muestra de uso veterinario	75
4.2.2.1 Modificación al proceso de extracción por disolventes	75
4.2.2.2 Efecto de la concentración de ácido clorhídrico sobre la extracción	76
4.2.2.3 Efecto del pH sobre la extracción	77
4.2.2.4 Efecto del disolvente sobre la extracción	79
Propuesta de la metodología analítica optimizada para la extracción de etoxiquin	81
PARÁMETROS DE CALIDAD	82
4.2.3 Determinación de Parámetros de Calidad	82
4.2.3.1 Determinación de la linealidad	83
4.2.3.1.1 De la determinación cuantitativa por CGC	83
4.2.3.1.2 De la metodología analítica propuesta	84
4.2.3.2 Determinación del límite de detección	85
4.2.3.3 Determinación de la reproducibilidad	86
4.2.3.4 Determinación del porcentaje de recobro	88



	Página
ANÁLISIS DE MUESTRAS	89
4.2.4 Análisis de muestras	89
4.3 EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (EFS)	91
4.3.1 Evaluación de fase amino, NH <sub>2</sub> (fase normal)	92
4.3.1.1 Estimación de volúmenes de disolventes para el lavado y elución del cartucho	92
4.3.1.1.1 Análisis cuantitativo del etoxiquin presente en la muestra con los volúmenes de disolventes estimados	94
4.3.1.2 Evaluación de la polaridad de una mezcla de hexano y metanol para una separación eficiente de etoxiquin	96
4.3.2 Evaluación de fase octadecil, C <sub>18</sub> (fase inversa)	98
4.3.2.1 Estimación de volúmenes de disolventes para el lavado y elución del cartucho	98
4.3.2.1.1 Análisis cuantitativo del etoxiquin presente en la muestra con los volúmenes de disolventes estimados	100
4.3.3 Estudios preliminares con cartucho OASIS (fase inversa)	103
CAPÍTULO 5	
5.0 CONCLUSIONES	105
RECOMENDACIONES	106
CAPÍTULO 6	
6.0 BIBLIOGRAFÍA	107
ANEXO 1 Análisis Estadístico	111
ANEXO 2 Espectrometría de Masas	122
ANEXO 3 Espectrofotometría de Ultravioleta	129
Índice de tablas	134
Índice de figuras	



## CAPÍTULO I

Figura 1.2.1 Estructura química del etoxiquin (6- Etoxi-1,2-dihidro-2,2,4-trimetilquinolina)	11
Figura 1.2.2 Estructura química de la quinoimina	12
Figura 1.2.3 Estructura química del dímero de etoxiquin	12
Figura 1.4.1 Métodos de extracción en fase sólida	22
Figura 1.4.2 Pasos a seguir para análisis por extracción en fase sólida	23
Figura 1.5.1 Equipo para análisis por CGC	26
Figura 1.5.2 Esquema de un sistema de CGC-EM	28
Figura 1.5.3 Espectrómetro de masas cuadrupolar	30

## CAPÍTULO 4

Figura 4.1.1 Curva de calibración de etoxiquin	61
Figura 4.2.1 a Cromatograma del análisis por CGC del extracto de estándar de etoxiquin sometido al proceso de extracción líquido-líquido informado en <i>J. Of the A.O.A.C.</i> 1964	63
Figura 4.2.1 b Cromatograma del análisis por CGC del extracto de la muestra	63
Figura 4.2.2 Cromatograma del análisis por CGC del extracto de estándar de etoxiquin sometido al proceso de extracción líquido-líquido informado en <i>Agric. Food. Chem.</i> , 1963	66
Figura 4.2.3 Cromatograma del análisis por CGC del extracto de la muestra	66
Figura 4.2.4 Espectro de masas del extracto de estándar de etoxiquin sometido al proceso de extracción publicado en <i>Agric. Food. Chem.</i> , 1963	67
Figura 4.2.5 Espectro de masas del extracto de la muestra	67
Figura 4.2.6 Análisis por espectrofotometría de UV-visible de la solución acuosa ácida resultante de la extracción	69
Figura 4.2.7 Análisis por espectrofotometría de UV-visible de los residuos de la extracción con diclorometano	70
Figura 4.2.8 Cromatograma del extracto de estándar de etoxiquin resultante	71
Figura 4.2.9 Cromatograma del extracto de la muestra resultante	71
Figura 4.2.10 Espectros de masas obtenidos del análisis de (a) estándar de etoxiquin y (b) extracto de muestra	72
Figura 4.2.11 Propuesta de metodología analítica para la extracción de etoxiquin de una muestra y su determinación cuantitativa por CGC	74
Figura 4.2.12 Extracción de estándar de etoxiquin con ácido clorhídrico a partir de disolución en isooctano variando la concentración del ácido	76
Figura 4.2.13 Extracción de estándar de etoxiquin a partir de disolución acuosa a diferentes valores de pH	78
Figura 4.3.13 Porcentajes de recuperación de etoxiquin con distintos disolventes	80
Figura 4.2.14 Propuesta de una metodología optimizada para la extracción de etoxiquin de una muestra y su determinación cuantitativa por CGC	81
Figura 4.2.15 Curva de calibración para determinar la linealidad del análisis por CGC	83



	Página
Figura 4.2.16 Curva de adiciones patrón para la determinación de la linealidad de la metodología analítica propuesta	84
Figura 4.2.17 Curva de calibración para determinar el límite de detección	85
Figura 4.2.18 Cromatograma de etoxiquin a una concentración de 0.9 ppb	86
Figura 4.2.19 Determinación de la reproducibilidad del análisis por residuos	87
Figura 4.2.20 Gráfica para obtener el porcentaje de recobro de la metodología analítica propuesta	88
Figura 4.2.21 Cromatograma típico obtenido del análisis del extracto de una muestra de uso veterinario (Lote CPT-43)	89
Figura 4.2.22 Espectro de masas de la identificación de etoxiquinolina	90
Figura 4.3.1 Estimación del volumen de disolvente Hexano y Metanol	93
Figura 4.3.2 a Cromatograma típico de una fracción eluida con Hexano	93
Figura 4.3.2 b Cromatograma típico de una fracción eluida con Metanol	93
Figura 4.3.3 Perfil de área de señal característica de etoxiquin	95
Figura 4.3.4 Porcentaje de extracción de etoxiquin con los volúmenes de disolventes estimados	96
Figura 4.3.5 Porcentaje de estándar de etoxiquin extraído	97
Figura 4.3.6 Estimación de volúmenes de disolvente Metanol y Hexano	99
Figura 4.3.7 a Cromatograma típico de una fracción eluida con Metanol	99
Figura 4.3.7 b Cromatograma típico de una fracción eluida con Hexano	99
Figura 4.3.8 Perfil de área de señal característica de etoxiquin	101
Figura 4.3.9 Porcentaje de extracción de etoxiquin con los volúmenes de disolventes estimados	102
Figura 4.4.1 Cromatograma de la EFS del estándar de etoxiquin en cartuchos OASIS	103
Figura 4.4.2 Cromatograma de la EFS de la muestra en estudio en cartuchos OASIS	104



	Página
<b>CAPÍTULO 1</b>	
Tabla 1.2.1 Propiedades físicas del etoxiquin	13
<b>CAPÍTULO 3</b>	
Tabla 3.1.1 Características de los cartuchos para EFS	39
Tabla 3.1.2 Características de las columnas	39
Tabla 3.2.1 Preparación de disoluciones de etoxiquin para curva de calibración	41
Tabla 3.3.1 Condiciones de temperatura para el análisis de etoxiquin por extracción L-L	42
Tabla 3.3.2 Concentraciones de ácido clorhídrico preparadas a partir de concentración 1 M	46
Tabla 3.3.3 Condiciones de temperatura para el análisis de etoxiquin	49
Tabla 3.3.4 Preparación de disoluciones de etoxiquin para la evaluación de la linealidad de las determinaciones cuantitativas	50
Tabla 3.3.5 Preparación de disoluciones de etoxiquin para la evaluación de la linealidad de la metodología propuesta	51
Tabla 3.4.1 Condiciones de temperatura para el análisis de etoxiquin	53
Tabla 3.4.2 Preparación de mezclas de metanol-hexano para la separación de etoxiquin	55
<b>CAPÍTULO 4</b>	
Tabla 4.1.1 Programa de temperaturas recomendado para una adecuada separación cromatográfica	60
Tabla 4.2.1 Porcentaje de extracción con diclorometano	70
Tabla 4.2.2 Comparación de áreas obtenidas con diferentes disolventes	79
Tabla 4.2.3 Resultados estadísticos para la determinación de la reproducibilidad de la metodología analítica propuesta	87
Tabla 4.2.4 Determinación cuantitativa por CGC del etoxiquin presente en tres lotes de muestra	90





## INTRODUCCIÓN

La gran mayoría de productos alimenticios de uso veterinario contienen cantidades significativas de ácidos grasos poli-insaturados para satisfacer las necesidades de los animales que los consumen; la simple exposición de éstos con el aire o bien un ligero calentamiento a temperatura ambiente pueden activar reacciones de oxidación de éstas grasas. Una vez que la oxidación en cadena empieza, el proceso es autocatalítico y por lo tanto difícil de detener; a lo que sobreviene la degradación de ácidos grasos esenciales y otros nutrientes como la vitamina A, vitamina E y carotenos. El resultado de esto no sólo es un olor desagradable, si no también la posible formación de compuestos tóxicos o de menor valor nutritivo.

Para evitar que ocurran este tipo de reacciones se adicionan a los productos veterinarios antioxidantes, que si no están en las proporciones adecuadas pueden provocar más daño al animal que lo consume que el beneficio que tiene la incorporación de éste al producto. Debido a que en muchas ocasiones, como el caso particular del etoxiquin, la cantidad contenida en el producto alimenticio no es solo resultado de la adición del antioxidante por el fabricante, si no que también puede provenir de la materia prima, es de vital importancia que se tenga conocimiento exacto de su contenido en los productos.

Actualmente la determinación cuantitativa de etoxiquin en alimentos, productos y aditivos de tipo veterinario incluyen análisis por HPLC/UV, HPLC/NCLD, extracción líquido-líquido con determinación por espectrofotometría de UV o fluorometría, etcétera entre otras.







El interés de este trabajo surgió a partir de que se observó, en el caso particular de la determinación cuantitativa del etoxiquin presente en el aditivo alimentario de uso veterinario con alto contenido en grasas, que no había concordancia en los resultados obtenidos por diferentes laboratorios aún cuando la técnica de análisis era la misma; esto nos hizo pensar si en realidad la técnica de análisis es la adecuada o mejor aún si se podía establecer una técnica alterna que proporcionara resultados más confiables.

La importancia del presente trabajo radica en la descripción de la propuesta de una metodología para la separación y análisis de etoxiquin a partir de un aditivo comercial de uso veterinario, seguida de su determinación cuantitativa por cromatografía de gases capilar; ya que ésta técnica permite detectar cantidades por debajo de las permitidas por las legislaciones sobre los alimentos de uso veterinario.





---

Abreviaturas y Símbolos

<b>A</b>	Área
<b>Abs</b>	Absorbancia
<b>ADI</b>	Acceptable Daily Intake (por sus siglas en inglés)
<b>A. Ext</b>	Antes de la Extracción
<b>A<sub>f.est</sub></b>	cantidad de Analito en fase estacionaria
<b>A<sub>f.móvil</sub></b>	cantidad de Analito en fase móvil
<b>AMA</b>	Administración de Medicamentos y Alimentos (USA)
<b>C<sub>18</sub></b>	octadecil
<b>CGC</b>	Cromatografía de Gases Capilar
<b>CGCAT</b>	Cromatografía de Gases Capilar de Alta Temperatura
<b>CGC-EM</b>	Cromatografía de Gases Capilar acoplado a Espectrometría de Masas
<b>d</b>	densidad
<b>d<sup>20</sup></b>	densidad medida a 20°C
<b>D</b>	razón de Distribución
<b>D'</b>	razón de Distribución Condicional
<b>D. Ext.</b>	Después de la Extracción
<b>EFS</b>	Extracción en Fase Sólida
<b>EM</b>	Espectrometría de Masas
<b>ETQ</b>	Etoxiquin
<b>FDA</b>	Federal Drug Administration (por sus siglas en inglés, USA)
<b>FID</b>	Flame Ionization Detector (por sus siglas en inglés)
<b>Hex</b>	Hexano
<b>λ</b>	Longitud de onda de máxima absorbancia
<b>L-L</b>	Líquido-Líquido
<b>M</b>	Molaridad (mol/L, mmol/mL)
<b>m/z</b>	relación masa carga de un fragmento de molécula
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>muv</b>	muestra de uso veterinario
<b>-NH<sub>2</sub></b>	isopropilamino
<b>PM</b>	Peso Molecular





<b>ppb</b>	parte por billón ( $10^{-9}$ de una parte, $\mu\text{g/Kg}$ , $\mu\text{g/L}$ , $\text{ng/g}$ , $\text{ng/mL}$ )
<b>ppm</b>	parte por millón ( $10^{-6}$ de una parte, $\text{mg/Kg}$ , $\text{mg/L}$ , $\mu\text{g/g}$ , $\mu\text{g/mL}$ )
<b>RA</b>	Reactivo Analítico
<b>std</b>	estándar
<b>TE</b>	Temperatura de Ebullición
<b>TEA</b>	Tri Etil Amina
<b>TF</b>	Temperatura de Fusión
<b>Time (min)</b>	Tiempo (minutos)
<b>uma</b>	unidad de masa atómica
<b>UV-vis</b>	Ultravioleta visible





---

Definiciones

<b>Adsorción:</b>	Fijación de especies a la superficie de un sólido sin que ocurra penetración de la especie a su interior.
<b>Afinidad:</b>	Medida de las interacciones específicas existentes entre un analito y las moléculas de la fase estacionaria.
<b>Cancerígeno:</b>	Cualquier agente químico, físico o biológico que puede causar cáncer.
<b>Constante de equilibrio:</b>	Valor numérico característico de un equilibrio; la constante de equilibrio se puede expresar como una función de las concentraciones involucradas tanto de reactivos como de productos, así como sus coeficientes estequiométricos.
<b>Cromatografía:</b>	Método de separación donde el analito se desplaza en forma continua a lo largo del sistema, ocurre en condiciones de equilibrio de reparto $c$ del soluto entre dos fases.
<b>Dímero:</b>	Unión química estable de dos moléculas de la misma especie con propiedades características.
<b>Disolución:</b>	Mezcla que resulta de disolver cualquier sustancia en un líquido. Fase líquida (o sólida) que contiene diversas sustancias.
<b>Disolvente:</b>	Constituyente mayoritario de una solución. Líquido que se utiliza para disolver.
<b>Efecto precrónico:</b>	Efecto que se produce por una exposición continua durante un largo periodo o fracción significativa del tiempo de vida (generalmente >50%) a un compuesto o producto.
<b>Efecto salino:</b>	Se favorece el desplazamiento de un analito hacia una fase orgánica por la adición de electrolitos a la fase acuosa, ambas en contacto.
<b>Elución:</b>	Proceso que consiste en la migración de un soluto al pasar un líquido o un gas a lo largo de una columna cromatográfica.
<b>Emulsión:</b>	Sistema constituido por una fase líquida continua y por lo menos una segunda fase líquida dispersa en la primera.
<b>Equilibrio:</b>	Estado de un sistema aislado, en el cual las variables de estado (temperatura, presión, composición) son las mismas en todos los puntos del sistema y permanecen fijas durante ese tiempo.





<b>Espectrometría de Masas</b>	Es una técnica instrumental con la que se puede caracterizar cualitativamente y cuantitativamente una muestra y/o determinar el peso molecular y la estructura de una sustancia.
<b>Espectrofotometría de Ultravioleta:</b>	Espectroscopia óptica en la que se emplea radiación ultravioleta, esta proporciona información estructural acerca del grado de conjugación de los electrones pi en moléculas orgánicas.
<b>Extracción:</b>	Transferencia de un soluto de una fase a otra.
<b>Fase estacionaria</b>	Sólido o líquido usado en cromatografía, las moléculas por separar se adsorben en la fase estacionaria y se desplazan a lo largo de esta con ayuda de la fase móvil.
<b>Fase móvil</b>	Disolvente (líquido o gas) que se utiliza en cromatografía para desplazar la muestra a lo largo de la fase estacionaria.
<b>Hidrocarburo:</b>	Compuesto constituido exclusivamente por carbono e hidrógeno, de fórmula empírica $C_xH_y$ .
<b>Oxidación:</b>	Aumento del número de oxidación de un elemento que interviene en un compuesto neutro o con carga, ganancia en el número de electrones de una especie.
<b>pH:</b>	Se define como la función logaritmo del inverso de la concentración de iones hidrógenos presentes en una disolución, nos da información acerca de la acidez o alcalinidad de una solución.
<b>Polaridad:</b>	Distribución asimétrica de la carga en las moléculas que resulta cuando un átomo atrae electrones más fuerte que otro.
<b>Saponificación:</b>	Nombre común de la hidrólisis de un éster inducida por una base a fin de producir la sal de un ácido carboxílico.



# **Capítulo 1**

# **Antecedentes**



## 1.0 ANTECEDENTES

### 1.1 ANTIOXIDANTES

#### 1.1.1 Generalidades

Las reacciones de oxidación son muy frecuentes en los sistemas biológicos y en alimentos, algunas de éstas son benéficas, mientras que otras pueden ser perjudiciales. En el organismo, los trastornos clínicos causales de las reacciones de oxidación pueden ir desde el envejecimiento hasta daños irreparables en sistemas vitales como el cardiovascular, renal y sistema nervioso entre otros. En los alimentos la degradación oxidativa de vitaminas, pigmentos y lípidos provoca pérdidas del valor nutritivo y desarrollo de olores desagradables.<sup>1</sup>

Una forma sencilla de aminorar o eliminar los daños ocasionados por la oxidación es incorporando al organismo por medio de los alimentos, compuestos antioxidantes que inhiben dichas reacciones. Entonces, un antioxidante es una sustancia presente en pequeñas concentraciones en relación a un sustrato oxidable, que inhibe o retarda significativamente la oxidación de dicho sustrato.

Los antioxidantes disminuyen significativamente los efectos adversos de las especies reactivas de oxígeno, de nitrógeno o ambas, sobre las funciones fisiológicas normales en seres humanos, de esta manera protegen de infecciones, deterioro celular, envejecimiento prematuro y, probablemente, del cáncer<sup>2</sup> (se dice que todos los antioxidantes actúan reforzando o debilitando a los cancerígenos dependiendo del tipo de cancerígeno, del tiempo de aplicación y el órgano sobre el cual actúe).<sup>3</sup>

El mecanismo de acción de los antioxidantes es simple, inhiben la oxidación del sustrato reaccionando con el agente oxidante es decir, los antioxidantes al chocar con un radical libre pierde electrones, se oxida y se transforma en un producto no tóxico.





### 1.1.2 Antioxidantes en los alimentos

Anteriormente el término "antioxidante" se aplicaba a todas las sustancias que inhibían las reacciones de oxidación independientemente de su mecanismo de acción; actualmente el término "antioxidante alimentario" se aplica a todos aquellos compuestos que interrumpen la reacción en cadena de los radicales libres formados en la oxidación de lípidos.<sup>1</sup>

Para seleccionar el antioxidante adecuado que hay que adicionar a los alimentos, se debe tomar en cuenta su *reactividad selectiva*, ya que deben ser inocuos con otros compuestos presentes en los alimentos; su *toxicidad*, no deben causar más daños que los beneficios que traen; su *potencia* que es la capacidad de inhibir la rancidez en un sistema lipídico, su *solubilidad en lípidos*, para que puedan llegar al sitio donde ejercen su acción; su *concentración*, ya que deben ser activos a bajas concentraciones (hasta 0.02% por kg de alimento); su *coloración*, tanto el antioxidante como sus productos de oxidación no deben modificar su color luego de un contacto prolongado con los alimentos, ya que se afectaría la calidad del producto; el *pH* del alimento debe ser el adecuado para promover su estabilidad, en caso contrario, se podría acelerar su oxidación o bien inactivarse y no llevar a cabo la función para la cual fueron adicionados.<sup>4</sup>

### 1.1.3 Clasificación de los antioxidantes

#### 1.1.3.1 De acuerdo a su origen

1.1.3.1.1 *Naturales o fisiológicos*: son aquellas sustancias presentes en plantas o en el organismo que presentan una actividad antioxidante, por ejemplo: glutatión, súper óxido dismutasa, tocoferoles, carotenoides, ácido ascórbico, flavonoides, vainillina y aminoácidos entre otros.

1.1.3.1.2 *Sintéticos*: éstos incluyen todas aquellas sustancias sintetizadas y naturales que han sido modificadas como el diterbutilhidroxianisol (BHA), diterbutilhidroxitolueno (BHT), terbutilhidroquinona, galato de isopropilo, palmitato de ascorbilo y etoxiquin.







### 1.1.3.2 De acuerdo a su mecanismo de acción

1.1.3.2.1 Donadores de protones: no detienen la formación de radicales libres que se generan en la oxidación sino que reaccionan con ellos y los estabilizan, produciendo así radicales de los antioxidantes que son menos activos y más estables, que por ende no promueven la oxidación.

1.1.3.2.2 Secuestradores de protones: previenen la participación de los metales de transición en la generación de radicales libres; los antioxidantes de este tipo eliminan los protones del medio necesarios para la reactividad de los metales presentes.<sup>4</sup>

1.1.3.2.3 Sinergistas: aquí se incluye la combinación de antioxidantes ya sean naturales y/o sintéticos, ésta proporciona una protección más completa que la que se puede alcanzar por un efecto aditivo de cada uno de ellos por separado; sin embargo su mecanismo de acción no se ha identificado detalladamente.<sup>1</sup>

### 1.1.4 Regulación de los antioxidantes en productos alimenticios

En lo que se refiere al uso de los antioxidantes en los alimentos, existen dos posiciones antagónicas; una que sostiene que son peligrosos potenciales para la salud y que por ende no deberían utilizarse y otra dice que mientras no se compruebe que un antioxidante es peligroso, su empleo está bien justificado para proteger al alimento de la alteración de valor nutritivo, textura y apariencia.

La FDA (por sus siglas en inglés Food and Drug Administration) regula y establece las propiedades y características que deben poseer los compuestos que pueden ser utilizados como antioxidantes en los alimentos.

En respuesta a la creciente preocupación sobre el posible papel de los aditivos alimentarios en el cáncer, en 1958 la FDA incorporó a la ley la enmienda de aditivos alimentarios que establece que ninguna sustancia podrá añadirse a los alimentos





si un ensayo adecuado comprueba que origina cáncer en personas o en animales; sin embargo la enmienda no toma en cuenta la dosis específica de una sustancia que es probable de encontrar en los alimentos, además no prevé la interpretación de los resultados en términos del sitio de carcinogénesis.

Una vez que se aprueba el uso de un antioxidante en determinado producto alimenticio, se establece oficialmente una ingesta diaria aceptable (ADI por sus siglas en inglés Acceptable Daily Intake); se analiza su toxicidad para verificar que puede ser incorporada en los alimentos sin causar daños al organismo y se determina la cantidad máxima de antioxidante que puede añadirse a los alimentos, esta no deberá superar la que razonablemente se necesite para conseguir el efecto físico, nutricional o de otro tipo. Como resultado de esto, a cada producto le corresponden unos límites máximos permitidos en cuanto al contenido de antioxidantes; sin embargo, la ingestión total de ciertos aditivos procedentes de diversas fuentes puede sobrepasar la ADI.<sup>5</sup>

Debido a que los ensayos de carcinogénesis y teratogénesis son costosos, los progresos en la investigación de las toxicidades crónicas de los antioxidantes son muy lentos lo cual afecta en gran parte la salida de un producto al mercado. Los daños que pueden provocar los antioxidantes al organismo están estrechamente relacionados con la cantidad de antioxidantes consumidos en los alimentos (ya sea por adición de éstos o por estar presentes en la materia prima en el caso de los antioxidantes naturales), por lo que es de vital importancia conocer el contenido de ellos en los alimentos de mayor consumo.

En general, la mayoría de los antioxidantes se utilizan en concentraciones de 100 a 200 ppm del contenido de lípidos en los alimentos,<sup>4</sup> con cantidades tan pequeñas, es necesario diseñar técnicas de separación y posterior concentración de ellos para mejorar su detección.

Existen diversos métodos validados (espectrofotométricos, cromatográficos, etcétera) para la identificación y cuantificación de antioxidantes en los alimentos; recientemente se han desarrollado métodos que detectan concentraciones tan pequeñas como 10 ppm por cromatografía de gases.<sup>4</sup>





## 1.2 ETOXIQUIN

### 1.2.1 Generalidades

En 1940 la FDA aprobó el uso del etoxiquin como antioxidante en alimentos para animales más no en los de consumo humano. Actualmente existe incertidumbre acerca de la toxicidad potencial del etoxiquin debido que en algunos ensayos de toxicidad se ha observado daño de riñón en ratas, en 1990 la FDA clasificó al etoxiquin como sustancia carcinogénica basándose en el consumo de niveles altos de etoxiquin de hasta 150 ppm; sin embargo esta actividad no ha sido comprobada.

El fabricante primario de etoxiquin en los Estados Unidos es la Compañía Química Industrial Monsanto, bajo el nombre comercial de Santoquin; en el resto del mundo, se puede encontrar bajo nombres comerciales como Emq, ETQ, santoflex a, stop-scald, santoquin, permanax 103, amea 100, dawes' nutrigard, quinol ed, nocrac aw, niflex d, antox, aries antox, antage aw, entre otros.

### 1.2.2 Propiedades del etoxiquin

#### 1.2.2.1 Propiedades Químicas

La estructura química base del etoxiquin (figura 1.2.1), es del tipo quinolínico (heterociclo con nitrógeno y anillos fusionados), esta es una estructura muy común en la naturaleza y muchos compuestos de esta clase presentan una notable actividad biológica.

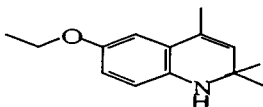


Figura 1.2.1 Estructura química del etoxiquin (6-Etoxi-1,2-dihidro-2,2,4-trimetilquinolina)

Cuando el etoxiquin lleva a cabo su actividad antioxidante, se descompone y cambia su estructura; los subproductos resultantes frecuentemente presentan también características antioxidantes.





En el caso del etoxiquin se documenta la formación de dos productos de oxidación el 2,6-dihidro-2,2,4-trimetil-6-quinoinmina (figura 1.2.2) y un dímero de etoxiquin, el 1,8'-di(6-etoxi-1,2-dihidro-2,2,4-trimetilquinolina) (figura 1.2.3), que se han encontrado en la mayoría de los alimentos que contienen etoxiquin.

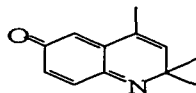


Figura 1.2.2 Estructura química de la quinoinmina

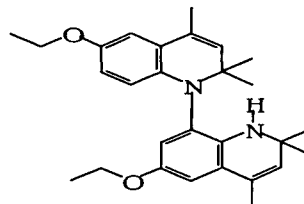


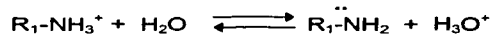
Figura 1.2.3. Estructura química del dímero de etoxiquin

Existen informes de otros subproductos que podrían llegar a formarse como resultado de la actividad del etoxiquin; sin embargo, su presencia no está del todo confirmada y, aunado a eso, los rendimientos en la formación de éstos subproductos estarían muy por debajo del valor observado para el dímero de etoxiquin y la quinoinmina, por lo que su estudio no se considera importante.

Los compuestos con grupos amino son generalmente polares, aunque el grado de polaridad depende de su estructura. Las aminas están altamente asociadas en el estado líquido por la formación de puentes de hidrógeno.

Las aminas, debido al par de electrones no compartido del átomo de nitrógeno, son consideradas como especies básicas que reaccionan con ácidos de Lewis para formar el ion amonio correspondiente. La base  $R_1-NH_2$  que resulta de la desprotonación del ácido débil  $R_1-NH_3^+$  es una base fuerte y al contrario, la base  $Ar-NH_2$  que resulta de la desprotonación de un ácido fuerte  $Ar-NH_3^+$ , es una base débil.

El equilibrio que describe uno de los casos mencionados se muestra a continuación:





Además de su comportamiento como bases, las aminas primarias y secundarias pueden considerarse como ácidos extremadamente débiles ya que sus protones N-H pueden sustraerse fácilmente por medio de una base lo suficientemente fuerte como  $\text{NaNH}_2$ ; con frecuencia es posible aprovechar la basicidad de la aminas para su purificación.

En el etoiquin debido a que el par de electrones no compartidos del nitrógeno no participa en los enlaces aromáticos  $\pi$ , se considera que puede actuar como una base de Lewis donando un par de electrones.

### 1.2.2.2 Propiedades Físicas

El etoiquin es un líquido oscuro y su color puede variar desde amarillo hasta café, presenta un olor parecido a los mercaptanos. En la tabla 1.2.1 se muestran algunas de sus propiedades físicas.<sup>32</sup>

Propiedades físicas	Valores informados
Peso molecular	217.31 g/mol
Punto de ebullición	123-125°C a 1 mm Hg
Punto de fusión	< 0°C
Constante de acidez	5.43 (pka calculado)
Gravedad específica	1.029-1.031 g/mL a 25°C
Viscosidad	20,000 centipoises a 32°F
Presión de vapor	0.000256 mm Hg a 25°C
Solubilidad	Miscible en aceite y grasas vegetales y animales Soluble en hidrocarburos Agua <1 mg/mL a 20°C DMSO $\geq$ 100 mg/mL a 20°C Etanol 95 % $\geq$ 100 mg/mL a 20°C Acetona $\geq$ 100 mg/mL a 20°C Tolueno Metanol

Tabla 1.2.1 Propiedades físicas del etoiquin





### 1.2.3 Usos del etoxiquin

El principal uso que se le ha dado al etoxiquin es el de antioxidante en comida para animales, ya que previene la degradación oxidativa de vitaminas y lípidos con lo cual se mantiene la calidad y el valor nutritivo de los alimentos. Aunque el etoxiquin no está permitido en la incorporación directa en la formulación de alimentos de consumo humano, la FDA lo ha aprobado para su uso como preservativo del color de especies rojas en la producción de pimentón, polvo del pimiento, paprika y polvo de chile rojo y como anti escaldante en peras y manzanas, todos éstos de consumo humano.

Otros usos que se le han encontrado al etoxiquin fuera de la industria alimentaria es como herbicida, insecticida y funguicida, regulador del crecimiento de plantas, evita la degradación del caucho y previene la combustión de los alimentos almacenados.

### 1.2.4 Toxicología del etoxiquin

#### 1.2.4.1 Tolerancia al etoxiquin

La FDA declaró que el contenido de etoxiquin en alimentos para animales no debe ser mayor a 150 ppm y no mayor a 25 ppm previa adición de productos naturales.

A su vez, la FDA marcó una tolerancia del residuo de etoxiquin en productos de consumo humano de origen animal de 0.5 ppm en la carne y sus subproductos, 3 ppm en la grasa cruda, pollería y huevos; y en peras y manzanas 3 ppm. La FDA no define un valor límite de exposición de los productos de consumo humano al etoxiquin.

#### 1.2.4.2 Toxicidad del etoxiquin

**1.2.4.2.1 Toxicidad en humanos:** No hay datos acerca de efectos precrónicos, crónicos, carcinogénicos, teratogénicos y de fertilidad provocados por el etoxiquin. La dermatitis por contacto se ha informado entre obreros que manejan o fabrican alimento para animales, en pruebas de parche se observaron resultados positivos al etoxiquin.





El nivel de etoxiquin ingerido en la dieta diaria no deberá ser mayor a 0.006 mg por kg de peso; por arriba de este nivel puede haber efectos tóxicos.

**1.2.4.2.2 Toxicidad en animales:** La eliminación de etoxiquin en orina y excremento de animales es rápida y completa; en algunos casos encontraron que la acumulación de etoxiquin puede darse en tejido graso, hígado y riñones de los animales en estudio. En perros a los que se les administraron dosis de 10 a 100 mg por kg de peso de etoxiquin, se observaron efectos adversos tales como pigmentación exógena, anorexia, dolor abdominal, daño nefrótico y aumento de peso en hígado y riñones. Se encontraron datos limitados del potencial carcinogénico de etoxiquin cuando se utilizaron dosis de 5,000 ppm de acuerdo al NTPRTP (por sus siglas en inglés National Toxicology Program in Research Triangle Park). El nivel de etoxiquin ingerido en la dieta diaria no deberá ser mayor a 75 mg por kg de peso, por arriba de este nivel puede haber efectos tóxicos.

En ratones, la administración del etoxiquin provocó un aumento en adenomas solitarios y linfomas, sin embargo, esto no fue un indicativo de carcinogenicidad. Estudios en ratas en los cuales se promovió la carcinogenicidad se observó un reforzamiento en la formación de tumores inducida por otros compuestos en estómago, esófago, colon y riñón.

#### 1.2.5 Análisis de etoxiquin

A través de los años los investigadores han tratado de encontrar la mejor forma de separar y analizar al etoxiquin partiendo de diversas matrices; la mayoría de ellos utilizan técnicas espectrofotométricas y fluorométricas. En 1963 Thomas Choy<sup>11</sup> sugiere el análisis de etoxiquin por cromatografía de partición gas-líquido isotérmica en columnas empacadas de 20% goma de silicón con detector de conductividad térmica; esta técnica de análisis tiene como inconveniente la saturación de la columna después de más de 10 análisis lo que implica gastos por uso de columnas. Después sugiere un método previo de separación de etoxiquin por medio de extracción líquido-líquido y el análisis por espectroscopía ultravioleta.<sup>7</sup>





A partir de aquí surgen diversas adaptaciones al método de Choy;<sup>7</sup> en 1964 Gordon<sup>10</sup> modifica la técnica de extracción líquido-líquido y realiza el análisis por fluorescencia, este fue el primer método oficial para determinar etoxiquin en alimentos para animales. Este es reemplazado rápidamente por el método de Deren<sup>9</sup> que realiza el análisis por fluorescencia pero modifica la técnica de extracción, éste hace una adaptación y conjunta las técnicas de extracción propuestas hasta ese tiempo obteniendo así mejores resultados, este método es utilizado actualmente para el análisis de músculo y tejido de pollo.

Las técnicas de separación siguen sufriendo pequeñas modificaciones que eliminan cada vez más las interferencias de muestras complejas, pero las técnicas de análisis, espectroscópicas y fluorométricas, son totalmente reemplazadas por otras más modernas que brindan mayor precisión en los análisis; López<sup>5</sup> en 1999 sugiere el análisis por CG en columnas empacadas silanizadas para muestras solubles en agua.

Recientemente Brannegan<sup>8</sup> en 2001 propone a la cromatografía de líquidos de alta resolución con detector de quimioluminiscencia (HPLC/CLND High Resolution Liquid Chromatography / ChemiLuminescence Nitrogen Detector) como una nueva y mejor forma de análisis de etoxiquin. Sin embargo falta mucho por encontrar con respecto a la separación y cuantificación de etoxiquin en muestras complejas, ya que todavía no se encuentra la técnica más adecuada para su análisis.

### 1.3 EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO (E.L-L)

#### 1.3.1 Generalidades de la técnica

La extracción líquido-líquido es un equilibrio de distribución de especies entre dos fases líquidas no miscibles, como técnica analítica es comúnmente empleada en la purificación y separación de impurezas de una muestra o de algún componente dentro de una mezcla compleja.





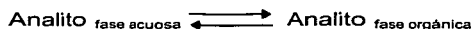


La técnica es rápida y requiere un montaje sencillo, sólo basta agitar un volumen de fase acuosa con un volumen significativamente menor de disolvente orgánico y así extraer y concentrar el constituyente de interés con recuperaciones de hasta en un 99.99% o más; cuando el porcentaje de extracción es menor la operación puede repetirse las veces que sean necesarias para conseguir una recuperación o eliminación cuantitativa, según sea el caso.

La eficiencia de la extracción líquido-líquido reside en la razón de distribución (D) del analito de interés entre las fases; controlando algunas características de la fase acuosa pH, fuerza iónica, adición de ligantes, etcétera, es posible modificar en forma considerable el valor de D.

### 1.3.2 Fundamentos de la técnica

El equilibrio que se lleva a cabo es el siguiente:



La razón de distribución (D) se define como el cociente de las concentraciones molares del analito en fase orgánica ( $C_{\text{org}}$ ) y en la fase acuosa ( $C_{\text{ac}}$ )

$$D = \frac{C_{\text{org}}}{C_{\text{ac}}} \quad \text{ecuación 1}$$

Puesto que generalmente se requiere el uso de diferentes volúmenes de las fases a utilizar, la razón de distribución se expresa:

$$D = \frac{n_{\text{org}}/V_{\text{org}}}{n_{\text{ac}}/V_{\text{ac}}} \quad \text{ecuación 2}$$

donde n representa el número de moles del analito y V el volumen utilizado de disolvente; con esta expresión podemos conocer de forma directa la eficiencia de la extracción.

$$\frac{n_{\text{org}}}{n_{\text{ac}}} = D \frac{V_{\text{org}}}{V_{\text{ac}}} ; \frac{n_{\text{ac}}}{n_{\text{org}}} = \frac{V_{\text{ac}}}{D V_{\text{org}}} \quad \text{ecuación 3}$$





Otra expresión de utilidad es la de la fracción de analito extraída en la fase orgánica (p)

$$p = \frac{n_{org}}{n_{total}} = \frac{n_{org}}{n_{org} + n_{ac}} = \frac{1}{1 + \frac{n_{ac}}{n_{org}}} = \frac{1}{1 + \frac{V_{ac}}{D V_{org}}} \quad \text{ecuación 4}$$

sustituyendo  $\frac{n_{org}}{n_{ac}} = D \frac{V_{org}}{V_{ac}}$  en la ecuación 4 tenemos que

$$p = \frac{1}{1 + \frac{V_{ac}}{D V_{org}}} = \frac{1}{\frac{D V_{org} + V_{ac}}{D V_{org}}} = \frac{D V_{org}}{D V_{org} + V_{ac}} \quad \text{ecuación 5}$$

El rendimiento de la extracción (%R) se puede conocer con la relación de analito en la fase orgánica y la cantidad total de analito.

$$\%R = \frac{C_{org} * V_{org}}{C_{org} * V_{org} + C_{ac} * V_{ac}} * 100 = p * 100 \quad \text{ecuación 6}$$

entonces la fracción p depende de la razón de distribución y de los volúmenes de fase acuosa y orgánica utilizadas. Entonces podemos controlar la eficiencia de una extracción eligiendo valores adecuados de los volúmenes  $V_{org}$  y  $V_{ac}$  o bien utilizando métodos químicos para influir en el valor de D, es decir modificando los equilibrios que ocurren en disolución, la forma más sencilla es controlando el pH de la fase acuosa.

Tomando como ejemplo los equilibrios



del cual definimos su constante de acidez como

$$K_a = \frac{[H^+][A^-]_{ac}}{[HA]_{ac}} ; [HA]_{ac} = \frac{[H^+][A^-]_{ac}}{K_a} ; [A^-]_{ac} = \frac{K_a[HA]_{ac}}{[H^+]} \quad \text{ecuación 7}$$

Donde sólo la especie HA es soluble en la fase orgánica, mientras que en la fase acuosa puede existir también como  $A^-$  por lo que su concentración condicional en la fase acuosa se describe como:

$$[HA']_{ac} = [HA]_{ac} + [A^-]_{ac} \quad \text{ecuación 8}$$





Entonces su razón de distribución condicional está dada por la expresión

$$D' = \frac{[HA]_{org}}{[HA]_{ac}} = \frac{[HA]_{org}}{[HA]_{ac} + [A^-]_{ac}} = \frac{[HA]_{org}}{[HA]_{ac} + \frac{ka[HA]_{ac}}{[H^+]_{ac}}} = \frac{[HA]_{org}}{[HA]_{ac}} * \frac{1}{\left\{1 + \frac{ka}{[H^+]}\right\}} \quad \text{ecuación 9}$$

Por lo tanto la expresión que rige a la constante de distribución condicional en este proceso es:

$$D' = \frac{D}{\left\{1 + \frac{Ka}{[H^+]}\right\}} \quad \text{ecuación 10}$$

Es evidente entonces, que tenemos dos formas principales de controlar la eficiencia de una extracción, una por métodos químicos y otra utilizando volúmenes adecuados de fase acuosa y fase orgánica.

### 1.3.3 Ventajas y desventajas de la técnica

Existen algunos aspectos que hacen atractiva a la técnica de extracción líquido-líquido:

- Aún cuando la constante de distribución del analito no sea muy grande, pueden realizarse extracciones sucesivas para aumentar la cantidad extraída hasta un valor aceptable.
- Los solutos presentes en concentraciones pequeñas pueden ser arrastrados a un volumen pequeño de un segundo disolvente, si la constante de reparto es grande, aumentando de esta manera la concentración del soluto.
- El proceso es aplicable de dos formas: la extracción de las sustancia interferentes, dejando el constituyente de interés en el primer disolvente, o bien por extracción de éste dejando las impurezas en el primer disolvente.





Sin embargo, la técnica presenta algunas desventajas frente a otras, por ejemplo el consumo de cantidades importantes de disolventes orgánicos por extracciones sucesivas hace a la técnica costosa; en ocasiones se presenta la formación de emulsiones que requieren otros tratamientos para eliminarlas, por lo que se vuelve una técnica invasiva y contaminante; la manipulación de la muestra es otro factor de desventaja en cuanto a las posibles pérdidas de analito de interés.

## 1.4 EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (EFS)

### 1.4.1 Generalidades de la técnica

La extracción en fase sólida es una alternativa más cómoda, sencilla y rápida de la extracción líquido-líquido, es una técnica que se utiliza para separar, limpiar y concentrar muestras analíticas de interés. Se basa en un equilibrio de adsorción de un analito en una fase estacionaria y su afinidad con una fase móvil.

La muestra se pasa a través de una pequeña columna empacada (cartucho) con material adsorbente, los compuestos orgánicos de la muestra se adsorben en el cartucho y después son eluidos con una pequeña cantidad de disolvente (2 a 10 mL).

### 1.4.2 Materiales de empaque para extracción en fase sólida

La extracción en fase sólida se agrupa en tres categorías de acuerdo a la actividad del soluto con la fase estacionaria.

#### 1.4.2.1 Fase normal

Cuando se tiene una fase estacionaria polar y la muestra a analizar es de naturaleza no polar, al pasarla a través del cartucho, se retienen los analitos polares y permiten que los analitos no polares pasen a través del cartucho. Los materiales de empaque de ésta categoría pueden ser de sílice, isopropilamina, cianopropil, florisil, alúmina y otros adsorbentes inorgánicos.





### 1.4.2.2 Fase inversa

Cuando se tiene una fase estacionaria no polar y la muestra a analizar es de naturaleza polar, al pasarla a través del cartucho se retienen los analitos no polares y los analitos polares pasan a través del cartucho. Las fases estacionarias de ésta categoría pueden ser compuestos como octadecano, octano, fenilos, ciclohexanos, entre otros, enlazados químicamente al soporte inerte. Actualmente éstos materiales de empaque pueden ser casi tan selectivos como la muestra lo requiera.

### 1.4.2.3 Intercambio iónico

La superficie del adsorbente ha sido modificada con funcionalidades ionizables, los analitos con cargas opuestas a las del relleno son retenidos en el cartucho, para eluir los analitos de interés se utilizan disolventes o disoluciones que contengan contraiones de mayor fuerza iónica.

## 1.4.3 Análisis por Extracción en Fase Sólida

### 1.4.3.1 Modos de extracción en fase sólida

Dependiendo de la naturaleza del material de empaque de los cartuchos y las características de la muestra a analizar, el proceso de extracción en fase sólida se puede llevar a cabo de dos maneras:

1.4.3.1.1 Retención de analitos de interés: los analitos de interés se adsorben en un material de relleno empacado dentro de una columna y el resto de la muestra pasa a través del empaque sin ser retenida (figura 1.4.1a), después los analitos de interés retenidos son eluidos selectivamente con un volumen pequeño de disolvente adecuado.

1.4.3.1.2 Elución directa de analitos de interés: los analitos de interés se recogen al finalizar su paso por la columna sin ser retenidos (figura 1.4.1b) y el resto de la muestra junto con los contaminantes se quedan en el relleno y se desechan.



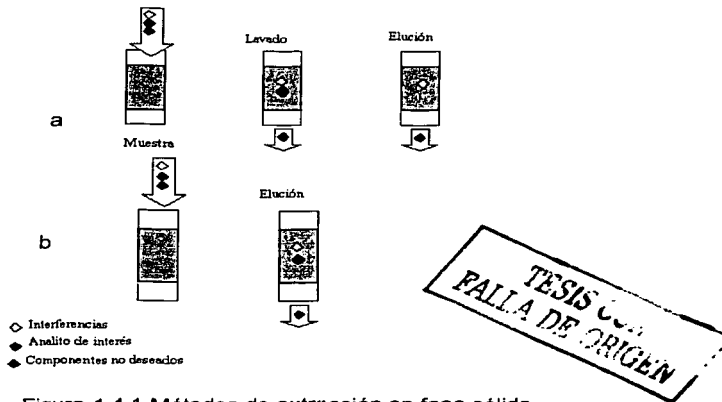


Figura 1.4.1 Métodos de extracción en fase sólida

### 1.4.3.2 Procedimiento de extracción en fase sólida (EFS)

Los pasos que se deben seguir para realizar un análisis por EFS se numeran a continuación:

**1.4.3.2.1 Acondicionamiento:** se debe tratar el cartucho con un disolvente que active al material de empaque, este disolvente depende del tipo de relleno y de la aplicación (figura 1.4.2a). Se debe tener cuidado con no dejar secar el cartucho debido a que la activación de los sitios donde puede llevarse a cabo la adsorción no sería homogénea a lo largo del cartucho por lo que las mediciones pudieran no ser confiables.

**1.4.3.2.2 Adición de muestra:** el volumen de muestra que se va a adicionar varía desde microlitros hasta 1 litro (figura 1.4.2b). Este volumen depende del análisis que se realice y de la cantidad de analito de interés en la muestra problema; en algunos casos se debe ajustar el pH de la muestra ya que se puede dañar el material de relleno.



1.4.3.2.3 Lavado: si los analitos de interés son retenidos, se deben eliminar los materiales no deseados o aquellos retenidos débilmente en el cartucho, para ello, se requiere pasar un volumen del mismo disolvente en que esta contenida la muestra para evitar la eliminación de los analitos retenidos (figura 1.4.2c), también se puede ajustar el pH de la disolución de lavado utilizando disoluciones amortiguadoras para una mayor eliminación de sustancias de interferencia; disolventes que difieran suficiente en polaridad con respecto al eluyente final son útiles como disoluciones de lavado. Si se utiliza un procedimiento en el cual los analitos de interés no son retenidos en el cartucho, se deberá pasar un volumen del disolvente en el que esta contenida la muestra para mejores recobros.

1.4.3.2.4 Elución: si los analitos de interés se quedaron retenidos en el cartucho, se deberá pasar un volumen pequeño de una disolución que desorba los compuestos de interés para eluirlos del cartucho y así concentrarlos (figura 1.4.2d); si es el caso en que los analitos de interés no fueron retenidos en el cartucho, no se requiere la elución de la muestra final.

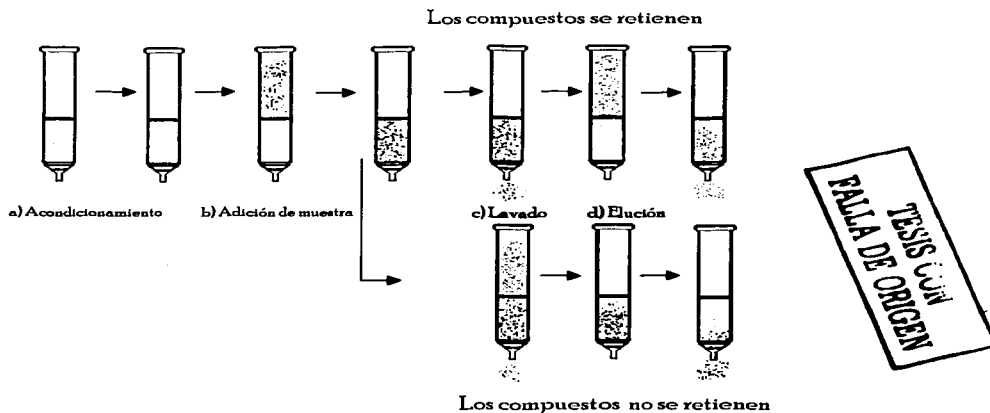


Figura 1.4.2 Pasos a seguir para análisis por extracción en fase sólida



#### 1.4.4 Ventajas y desventajas de la técnica

La EFS tiene ventajas sobre las técnicas convencionales de preparación de muestras ya que reduce el uso de los disolventes utilizados en el análisis, se pueden obtener factores de concentración grandes para los analitos de interés, y por lo tanto se pueden alcanzar porcentajes de recuperación altos, sirve como técnica preparativa para la purificación de extractos y es posible automatizarla. No se requiere que los disolventes utilizados sean inmiscibles entre sí, se evita la formación de emulsiones; una de sus principales ventajas es que se reduce al máximo la producción de residuos contaminantes debido a que el cartucho se puede eliminar con el resto de la muestra que quedó adsorbida. Una de sus principales desventajas es que los compuestos de alto peso molecular (mayor a 2000 uma) no se adsorben en el material de empaque, lo mismo ocurre con moléculas muy pequeñas y el costo de los cartuchos es comparable con el costo de los materiales que se utilizan en otras técnicas similares.

### 1.5 CROMATOGRAFÍA DE GASES CAPILAR (CGC)

#### 1.5.1 Generalidades de la técnica

La Cromatografía de Gases Capilar (CGC) es un método de separación basado en un equilibrio de distribución y elución de la muestra entre dos fases, una estacionaria (película delgada de líquidos de alto punto de ebullición que recubren las paredes del capilar) y una móvil (gas acarreador), la separación depende del tiempo que pasan disueltos los analitos en la fase estacionaria.

#### 1.5.2 Fundamentos de la técnica

La separación cromatográfica se basa en el equilibrio de distribución de un analito (A) en particular entre una fase estacionaria y una fase móvil:







La relación de concentraciones del analito presente en la fase estacionaria y la fase móvil

$$K = \frac{[A]_{f.estacionaria}}{[A]_{f.móvil}} \quad \text{ecuación 11}$$

está relacionada a su vez con el tiempo de retención ( $t_r$ ) del analito en la columna y el tiempo que tarda en recorrer la fase móvil la columna ( $t_m$ ) por la expresión

$$t_r = t_m + t_m K' \quad \text{ecuación 12}$$

Donde  $t_r$  y  $t_m$  son parámetros experimentales que se obtienen a partir de un análisis cromatográfico; el monitoreo de éstos parámetros nos ayuda a definir el equilibrio de distribución del analito en las dos fases.

Otros parámetros de importancia que se deben tomar en cuenta en una separación cromatográfica son:

- a) Retención: se define como el tiempo transcurrido entre la inyección de la muestra y el máximo del pico cromatográfico ( $t_r$ ). El tiempo de retención ajustado ( $t_r'$ ) se determina como la diferencia entre el  $t_r$  y  $t_m$ , este parámetro refleja las características físico-químicas de retención de un compuesto.
- b) Selectividad: es la capacidad de un sistema cromatográfico para diferenciar entre dos compuestos, este parámetro depende únicamente de las características de la columna.
- c) Eficiencia: esta representada por el número de sitios teóricos de la columna donde pueden ocurrir los equilibrios de distribución.
- d) Resolución: es la capacidad de un sistema para diferenciar entre dos señales cromatográficas.

### 1.5.3 Equipo de Cromatografía de Gases Capilar

La muestra se introduce a través del inyector donde se vaporiza y es arrastrada por el gas acarreador hacia la columna, en la columna se reparte entre la fase móvil y la estacionaria y es ahí donde se lleva a cabo la separación de componentes; los componentes que presenten mayor afinidad por la columna se desplazarán con mayor lentitud y eluyen





mucho después de la columna. Después, la muestra pasa hacia el detector donde se genera una respuesta que es proporcional a la concentración de analito presente; esta señal pasa a través de un procesador de datos que genera el registro de picos o cromatograma con las áreas de los picos relacionadas con la concentración de analito en la muestra analizada.

El detector universal para compuestos orgánicos es el de ionización en flama FID (por sus siglas en inglés), las moléculas orgánicas que llegan hasta la flama se queman y forman partículas cargadas; la presencia de éstas partículas en el espacio entre los dos electrodos que constituyen al detector origina una corriente que es medida con una resistencia, la modificación del potencial resultante se amplifica y es dibujada como un pico en el registrador. El FID puede presentar un límite de detección de hasta  $10^{-11}$  g/s y responde a todo tipo de compuestos orgánicos (de aquí que se considere como uno de los detectores más importantes), sin embargo no presenta respuesta a la presencia de aire, agua, gases inertes, CO, CO<sub>2</sub>, NO, CS<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>S; por ser insensible al aire y agua el detector es el apropiado para análisis de trazas de materia orgánica en aire y agua; sin embargo tiene la desventaja de ser destructivo. El equipo de CGC se ilustra a continuación en la figura 1.5.1.

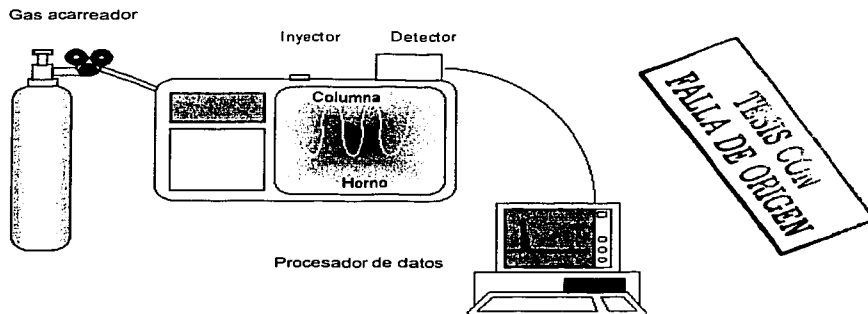


Figura 1.5.1 Equipo para análisis por CGC





#### 1.5.4 Ventajas y desventajas de la técnica

Las ventajas de la CGC son la alta resolución, velocidad en el tiempo de análisis, sensibilidad, sencillez y resultados cuantitativos confiables. Su principal limitación es que sólo se pueden analizar compuestos relativamente volátiles; a menudo se deben eliminar las interferencias de la muestra, es una técnica deficiente para análisis cualitativos y preparativos. Los compuestos muy polares y de alto peso molecular ( $> 600$  uma) no se pueden analizar por CGC debido a su alta presión de vapor.

Debido a estas limitaciones, se han tenido que realizar modificaciones de la CGC para su uso en análisis de productos naturales (por ejemplo); de éstas modificaciones surge una nueva rama de la cromatografía: la de alta temperatura.

#### 1.5.5 Cromatografía de Gases Capilar de Alta Temperatura (CGCAT)

La Cromatografía de Gases Capilar de Alta Temperatura (CGCAT) es una rama de la cromatografía que se encarga del análisis de compuestos de alto peso molecular ( $< 600$  uma) y compuestos orgánicos termolábiles que se llevan a cabo a temperaturas mayores de  $390$  °C y con un máximo de hasta  $450$  °C en el horno.

Una de las limitaciones que había para la CGCAT eran las columnas de trabajo ya que las columnas capilares de sílice fundida convencionales son estables hasta temperaturas de  $320$  °C, por lo que hubo la necesidad del desarrollo de nuevas columnas como las de sílice recubiertas de aluminio que soportan temperaturas de hasta  $500$  °C teniendo como desventaja que presentan expansión diferencial entre la capa de aluminio y la sílice, y las recubiertas de poliimida que soportan temperaturas de hasta  $450$  °C teniendo como desventaja que llegan a descortezarse cuando son expuestas a altas temperaturas durante periodos prolongados. Aún así, ambas presentan la ventaja de soportar temperaturas extremas.

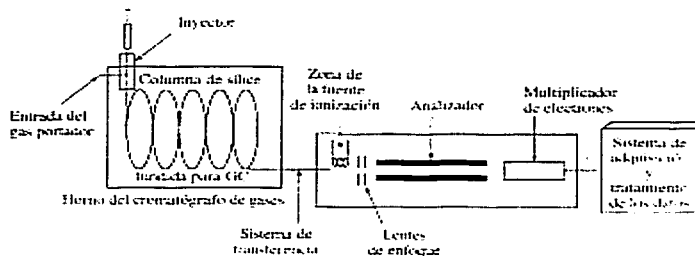




Otra de las limitaciones existentes para la CGCAT era la forma de introducción de la muestra, ya que en el caso de compuestos de baja volatilidad pueden quedarse permanentemente en el inyector y no pasar a la columna de separación. Por lo tanto hubo la necesidad del desarrollo de nuevas formas de inyección de muestra, como el inyector "on column" donde estrictamente no existe físicamente un inyector ya que la muestra se introduce en la columna directamente por medio de una jeringa especial con diámetro menor de la aguja que el de la columna, sin calentamiento previo de la muestra o mezclado con el gas acarreador. Debido a la forma de introducción de la muestra, hace que la técnica de CGCAT sea de excelente precisión y exactitud para determinaciones cuantitativas de muestras con un amplio rango de volatilidad, su principal desventaja es la contaminación de la columna debido a la posible formación de residuos permanentes en la columna.

### 1.5.6 Sistemas acoplados Cromatografía de Gases Capilar – Espectrometría de Masas (CGC-EM)

La CGC a menudo se combina con otras técnicas analíticas dando como resultado sistemas acoplados que proporcionan más herramientas útiles para la identificación de los componentes de una muestra. En este caso particular el sistema acoplado CGC-EM es de vital interés debido a que con la CGC se realiza la separación de compuestos en una mezcla compleja y con la Espectrometría de Masas (EM) se confirma la identidad de cada fracción que sale del cromatógrafo de gases. El esquema de un sistema acoplado de CGC-EM se muestra a continuación en la figura 1.5.2



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Figura 1.5.2 Esquema de un sistema CGC-EM





En los sistemas acoplados de CGC-EM la forma de *entrada de la muestra* es por medio del cromatógrafo de gases y su objetivo es introducir una pequeña cantidad de muestra gaseosa en el espectrómetro de masas. La función de la *fuerza de iones* es la de transformar los componentes gaseosos en iones, obteniendo así un haz de iones positivos (generalmente) y negativos que posteriormente se aceleran hacia el interior del analizador de masas. La función del *analizador* es la de dispersar los fragmentos iónicos obtenidos de acuerdo a su relación carga / masa ( $m/z$ ); los espectrómetros de masas se clasifican dependiendo de la naturaleza del analizador de masas. Los fragmentos iónicos llegan hasta el *detector* donde se genera una señal proporcional a la cantidad de señales de una misma relación  $m/z$  y se traduce en un espectro de masas.

Un requerimiento importante de los espectrómetros de masas es que la fuente de iones, el analizador y el detector se deben encontrar al vacío (presiones alrededor de  $10^{-5}$  torr) con el fin de evitar que se produzcan colisiones de los fragmentos iónicos con otras moléculas, fragmentos iónicos, agua o aire del ambiente que puedan, al ser detectados, alterar la identificación de los analitos de interés.

El analizador de masas cuadrupolar, figura 1.5.3, es el corazón de un espectrómetro de masas ya que es el sitio donde se lleva a cabo la separación de los fragmentos iónicos formados. Esta conformado por cuatro barras cilíndricas paralelas que actúan como electrodos, las barras se conectan eléctricamente de la siguiente forma: un par de barras opuestas se conectan al polo positivo de una fuente variable de corriente continua y el otro par se conectan a la terminal negativa; se aplica a cada par de barras potenciales variables de corriente alterna de radiofrecuencia desfasados 180 grados. Cuando los iones son acelerados en el espacio entre las barras, la corriente continua y alterna se incrementan mientras se mantiene constante su relación; los iones que presentan un determinado valor de  $m/z$  chocan con las barras y se convierten en especies neutras, los iones cuyo valor de  $m/z$  este dentro de un intervalo limitado pasarán a través de las barras hasta alcanzar el detector, los instrumentos cuadrupolares separan fácilmente iones que difieren en su masa en una unidad de masa.



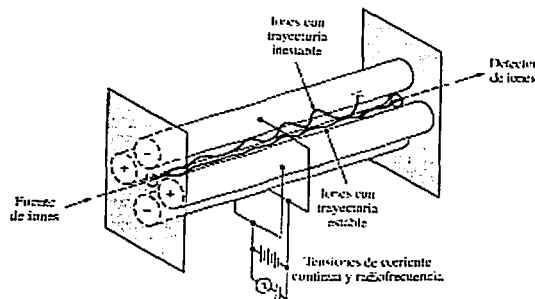


Figura 1.5.3 Espectrómetro de masas cuadrupolar

Las ventajas de los espectrómetros de masas cuadrupolares incluyen que son los más compactos, baratos y robustos, además presentan una elevada velocidad de barrido de manera que se puede obtener un espectro de masas en un tiempo muy corto.

Los sistemas de CGC-EM se han utilizado para la identificación de los cientos de componentes presentes en sistemas naturales y biológicos, además han permitido caracterizar los componentes responsables del olor y del sabor en los alimentos, identificar contaminantes del agua, llevar a cabo diagnósticos médicos basados en los componentes del aliento y estudios sobre los metabolitos de fármacos, entre otras cosas.

### 1.5.7 Análisis Cuantitativo

Un análisis cuantitativo por cromatografía de gases es susceptible a errores tanto sistemáticos como aleatorios como cualquier otra técnica de cuantificación, por ello, se hace necesario el uso de métodos de calibración apropiados. Existen diversos métodos para realizar análisis cuantitativo confiables por CGC, los más utilizados se discuten a continuación.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN





### 1.5.7.1 Método de calibración absoluta (Curva de calibración)

Se inyectan cantidades conocidas de analito puro, los resultados se representan en una gráfica de área de pico en función de la concentración o peso de analito puro; así se obtiene una línea recta que debe pasar por el origen (no hay muestra, no hay respuesta). Después se inyecta una cantidad conocida de muestra y a partir de la curva de calibración se interpola en la gráfica al valor del área resultante, conociendo así, inmediatamente, la concentración de analito en la muestra. Las desventajas de este método es que debe conocerse exactamente la cantidad de muestra inyectada, además que la calibración requiere de tiempo; para que los resultados se puedan comparar significativamente, la sensibilidad del detector debe permanecer constante a lo largo del análisis.

### 1.5.7.2 Método de estándar interno

El método del estándar interno debe su nombre a la forma como se preparan las muestras a ser analizadas, el estándar interno es una sustancia que se añade al inicio de los tratamientos a todas las muestras y estándares en cantidad conocida y suficiente para poder ser determinado sin problemas, su adición no debe de causar ningún tipo de interferencia en el análisis.

Cuando las señales del analito y del estándar interno responden proporcionalmente a las fluctuaciones del método y del instrumental empleado, la razón de estas señales es independiente de tales fluctuaciones, de esta forma, el método compensa errores provenientes de la manipulación de la muestra, reduce errores por inyección, pérdidas por evaporación y aumenta en algunos casos la reproducibilidad y precisión del método.

Los resultados relacionan el peso de la muestra con el peso del estándar y se realiza una gráfica de relación de áreas de muestra/estándar ( $A_m/A_s$ ) en función de la relación de concentraciones de la muestra/estándar ( $C_m/C_s$ ), obteniéndose una línea recta.

El estándar interno debe cumplir con las siguientes características: a) debe tener una estructura similar al analito de interés para que su respuesta analítica sea lo más parecida al compuesto de interés, b) debe ser químicamente estable en la muestra a analizar, ya que si reacciona con algún componente de la muestra, su concentración, respuesta y





detección no será igual en todo el análisis, c) debe tener un tiempo de retención y altura de pico similar al analito de interés, es decir un factor de respuesta similar, d) se debe separar perfectamente de la muestra problema para integrarlo fácilmente y libre de interferencias.

### **1.5.7.3 Método de adiciones patrón**

Este método es útil para el análisis de muestras complejas en las que las interferencias debidas a la matriz son de consideración. El método incluye la adición de diferentes cantidades de una disolución patrón del analito que se desee determinar a un volumen determinado de muestra; si la cantidad de muestra es limitada se pueden realizar adiciones sucesivas del patrón a un único volumen de muestra tomando en cuenta en cada caso el efecto de dilución que se produce.

Este método toma en cuenta la propuesta de que después de cada adición, la matriz de la muestra permanece casi idéntica y por lo tanto la única diferencia existente es la concentración de analito, de esta forma, el método compensa los errores por las interferencias de la matriz de la muestra.

Los resultados relacionan el área del analito presente en función de la cantidad de analito adicionada. Si la respuesta del equipo es proporcional a la concentración del analito se debe obtener una línea recta donde la diferencia de la cantidad añadida de patrón en el origen (sin adición) y el valor de la cantidad en el punto de intersección de la línea recta con el eje de las x (cantidad de patrón adicionada) es el valor absoluto de la cantidad de patrón que equivale a la cantidad de analito en la muestra misma que también puede obtenerse por la interpolación de la línea recta hasta la intersección con el eje x. Además, la intersección con el eje de las x corresponde a la señal cero del instrumento.





# **Capítulo 2**

# **Objetivos**

32-A

## 2.0 OBJETIVOS

**Problema a solucionar:** Se encontró que cuando dos laboratorios utilizan una misma metodología para la determinación cuantitativa del etoxiquin contenido en un aditivo para uso en alimentos veterinarios, los resultados no son comparables, lo que nos lleva a pensar que la metodología de análisis no es la más adecuada.

Debido a que tenemos conocimiento de la complejidad de la muestra comercial por su alto contenido en grasas, mezcla de antioxidantes y colorantes, resulta de vital importancia el diseño de una metodología analítica que nos proporcione determinaciones cuantitativas confiables y libres de interferencias, una técnica que puede cumplir con éstas exigencias es la CGC ya que en condiciones óptimas arroja resultados confiables, reproducibles, y además es una técnica sencilla y en comparación con otras es de bajo costo.

De acuerdo con esto se plantearon los siguientes objetivos para el presente proyecto:

### 2.1 OBJETIVO GENERAL:

Separar al etoxiquin presente en un producto de uso veterinario por extracción y proponer una metodología para su cuantificación por cromatografía de gases capilar.

### 2.2 OBJETIVOS PARTICULARES:

#### 1. Evaluación de tres diferentes técnicas de separación y extracción:

- 1.1 Cromatografía de gases capilar a altas temperaturas (CGCAT)
- 1.2 Extracción en fase sólida (EFS)
- 1.3 Extracción líquido-líquido (Extracción L-L)





2. Proponer una metodología de separación de etoxiquin en un producto de uso veterinario y evaluar el método con sus parámetros de calidad que establezcan la confiabilidad de su cuantificación.
  - 2.1 Determinación del límite de detección, linealidad, % de recuperación y repetibilidad del análisis.
3. Realizar la determinación cuantitativa de etoxiquin por cromatografía de gases capilar en la muestra de aditivo de uso veterinario empleando el método de separación adecuado.



# **Capítulo 3**

## **Parte Experimental**

134 - A



## 3.0 PARTE EXPERIMENTAL

### 3.1 REACTIVOS, EQUIPO Y MATERIAL

#### 3.1.1 Reactivos utilizados

Las características y calidad de los reactivos utilizados en la elaboración de este trabajo se establecieron de acuerdo a los datos informados por el fabricante.

##### 3.1.1.1 Líquidos

**2,2,4-trimetilpentano**, isobutiltrimetilmetano,  $\{(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{-C}(\text{CH}_3)_3\}$ , comúnmente llamado "isooctano", líquido inflamable con olor a gasolina, PM=114.23 g/mol, TE=98-99 °C, TF=-107 °C, d=0.692 g/mL, 99+% de pureza, nanogrado, Aldrich Chemical Company.

**2-Propanona**, dimetilcetona, acetona  $\{\text{CH}_3\text{COCH}_3\}$ , líquido inflamable, muy volátil, de olor característico, sabor ligeramente dulce, pungente, PM=58.08 g/mol, TF=-94 °C, TE=56.5 °C,  $d^{20}=0.788$  g/mL, R.A., J.T. Baker.

**Ácido clorhídrico**,  $\{\text{HCl}\}$ , líquido incoloro, olor pungente característico, corrosivo, no inflamable, PM=36.46 g/mol, TF=-114.22 °C, TE=-85.05 °C, pureza 36.5-38.0 %, R.A., J.T. Baker.

**Alcohol Etilico Absoluto anhidro**, etanol  $\{\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}\}$ , líquido inflamable, de olor agradable, sabor astringente, absorbe humedad del ambiente rápidamente, PM=46.07 g/mol, TF=-114.1 °C, TE=78.5 °C,  $d^{20}=0.789$  g/mL, absoluto, J.T. Baker.

**Alcohol metílico**, metanol, carbinol, alcohol de madera,  $\{\text{CH}_3\text{OH}\}$ , líquido inflamable, venenoso, ligero olor a alcohol cuando esta puro, olor pungente en presencia de otros materiales, PM=32.04 g/mol, TE=64.7 °C, TF=-97.8 °C,  $d^{20}=0.7915$ , HPLC, JT. Baker.





**Cloruro de metileno**, diclorometano,  $\{\text{CH}_2\text{Cl}_2\}$ , líquido incoloro, sus vapores no son inflamables y cuando se mezclan con el aire no es explosivo, PM=84.93 g/mol, TE=39.75 °C, TF=-95 °C,  $d^{20}=1.3255$  g/mL, RA, Mallinckrodt.

**Hexanos**,  $\{\text{C}_6\text{H}_{14}\}$ , líquido incoloro, muy volátil, olor peculiar, PM=86.18 g/mol, TE=69 °C, TF=-95 °C,  $d^{20}=0.660$ , HPLC, J.T. Baker.

**Lidocaína**, xilocaína, 2-dietilamino-2',6'-dimetilacetanilida,  $\{\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}\}$ , PM=234.33 g/mol, TE=180 °C, TF=68 °C en alcohol o benceno, disolución al 2%, Lab. ASTRA.

**Tolueno**, metilbenceno,  $\{\text{C}_7\text{H}_8\}$ , líquido inflamable, olor similar al benceno, PM=92.13 g/mol, TE=110.6 °C, TF=-95 °C,  $d^{20}=0.866$  g/mL, HPLC, J.T. Baker.

**Trietilamina**, N,N-dietiletanamina,  $\{\text{C}_6\text{H}_{15}\text{N}\}$ , líquido de ligero color amarillo, fuerte olor amoniacal, PM=101.19 g/mol, TE=-115 °C, TF=90 °C,  $d=0.73$  g/mL, pureza 99%, cromatográfico, MERCK-Shuchardt.

### 3.1.1.2 Sólidos

**Bicarbonato de sodio**, carbonato ácido de sodio,  $\{\text{CHNaO}_3\}$ , cristales blancos, PM=84 g/mol, Pharmacia Upjohn.

**Cloruro de sodio cristal**, sal;  $\{\text{NaCl}\}$ , cristales blancos transparentes, PM=58.44 g/mol,  $d^{20}=2.17$  g/mL, TF=804 °C, J.T. Baker.

**Hidróxido de potasio**, potasio hidratado, potasa cáustica;  $\{\text{KOH}\}$ ; perlas de color blanco muy higroscópicas, PM=56.11 g/mol, TF=360 °C, Mallinckrodt.

**Indol**, 2,3.benzopirrol,  $\{\text{C}_8\text{H}_7\text{N}\}$ , cristales con ligera coloración naranja muy higroscópicos, de intenso olor fecal, PM=117.14 g/mol, TE=52 °C, TF=245 °C, s/marca.

**Sulfato de sodio anhidro**,  $\{\text{Na}_2\text{SO}_4\}$ , cristales blancos, PM=142.04 g/mol, TF=800 °C, insoluble en agua, J.T. Baker.





### 3.1.1.3 Gases

**Aire Comprimido**, gas no inflamable, calidad extra seco, INFRA SA de CV.

**Hidrógeno** {H<sub>2</sub>}, gas inflamable, calidad cromatográfico 99.998% mínimo de pureza, INFRA SA de CV.

**Helio Comprimido** {He}, gas no inflamable, calidad ultra puro 5.0, PRAXAIR.

**Nitrógeno** {N<sub>2</sub>}, gas no inflamable, calidad cromatográfico 99.998% mínimo de pureza, INFRA SA de CV.

### 3.1.1.4 Muestra comercial de uso veterinario

La muestra comercial en estudio fue proporcionada por el Dr. Vicente Ridaura de la compañía BIOQUIMEX REKA SA de CV, Carr. Campo Militar Km095 CP 76135 Qro,Qro. Presentaba las siguientes características físicas: sólido grueso que fácilmente se adhiere a las paredes donde está contenido, coloración naranja, parcialmente soluble en hexano, metanol, diclorometano, acetona y otros disolventes. Con respecto a sus características químicas se tiene conocimiento de su contenido: mezcla de tocoferoles, colorantes naturales, etoxiquin, vitaminas, carotenoides, un alto contenido de diversos ácidos grasos y aceites vegetales y animales. Las muestras se mantuvieron en bolsas selladas herméticamente de aproximadamente 100 g identificadas con las siguientes especificaciones: CaroPet (esterified carotenoids from *Tagetes erecta*); minimum t-lutein concentration 40g/kg. Lotes 897914, 89375 y CPT-43. Con respecto a su uso se sabe que la muestra en estudio se utiliza como aditivo antioxidante y nutricional para alimento de uso veterinario (específicamente alimento para perros).

## 3.1.2 Equipo

### 3.1.2.1 Mediciones por Cromatografía de Gases Capilar (CGC)

Para las determinaciones por CGC se utilizó un cromatógrafo de gases (Hewlett Packard, 5890 Series II) a presión constante, gas acarreador nitrógeno, equipado con un sistema de inyección en columna, detector de ionización de flama y un integrador (Hewlett Packard, 3396 A).





Para las determinaciones por CG-EM se utilizó un cromatógrafo de gases (Hewlett Packard, 5890), gas acarreador helio, equipado con un sistema de inyección split-splitless, detector de masas selectivo (Hewlett Packard, 5971) acoplado a un procesador de datos.

Para las determinaciones cuantitativas por CGC se utilizó un cromatógrafo de gases (Hewlett Packard, 5890 Plus Series II) de flujo constante, gas acarreador nitrógeno, equipado con un sistema de inyección en columna, detector de ionización de flama acoplado a un procesador de datos.

### **3.1.2.2 Mediciones por Espectrofotometría de Ultravioleta-visible**

Para las determinaciones por Espectrofotometría UV-visible se utilizó un espectrofotómetro (Hewlett Packard, 8452 A) con arreglo de diodos acoplado a un procesador de datos.

### **3.1.2.3 Mediciones Potenciométricas**

Para las determinaciones potenciométricas (pH) se utilizó un potenciómetro (OAKTON pH/mV/°C, WD-35617 series Benchtop meters) equipado con un electrodo de vidrio (Cole Parmer, 60061).

## **3.1.3 Material**

### **3.1.3.1 Material de laboratorio**

Se utilizaron diversos materiales de vidrio comunes en un laboratorio como pipetas volumétricas de 1, 2, 3, 4, 5 y 10 mL; pipetas graduadas de 1, 2, 5 y 10 mL, frascos viales de 1, 6, 15 y 20 mL; tubos de ensaye con tapa de rosca de 15 mL, matraces erlenmeyer de 25 mL, matraces volumétricos de 1, 2, 5, 10, 25, 50 y 100 mL; pipetas pasteur, tubos de ensaye graduados de 12 mL, vasos de precipitados de 10, 20, 50 y 100 mL; probetas de 50 y 100 mL; embudos de separación de 30 y 60 mL; micro-jeringas de 5, 10, 50, 100 y 500  $\mu$ L, cronómetros digitales, balanza analítica digital, gradillas, espátulas de aluminio y vórtex.





### 3.1.3.2 Cartuchos para EFS

Las características de los cartuchos utilizados para EFS se muestran en la tabla 3.1.1

Nombre del cartucho	- NH <sub>2</sub>	C <sub>18</sub>	OASIS HLB
Tipo de fase	Normal	Inversa	Inversa
Grupo químico enlazado	Aminopropil	Octadecil	Divinilbenceno, N-vinilpirrolidona
Masa de f <sub>ost</sub> por cartucho	500 mg	500 mg	500 mg
Rango de pH de estabilidad	2 - 7	2 - 7	0 - 14
Marca	SUPELCO	SUPELCO	WATERS

Tabla 3.1.1 Características de los cartuchos para EFS

### 3.1.3.3 Columnas para CGC

Las características de las columnas cromatográficas utilizadas en el presente proyecto se muestran en la tabla 3.1.2.

Columna	AL-CLAD	PTE-5	Ultra Alloy
Fase estacionaria	Metil silicón	5% fenil metil siloxano	50% fenil metil silicón
Naturaleza	No Polar	Polaridad intermedia	Polar
Longitud	15 m	30 m	15 m
Diámetro interno	0.25 mm	0.25 mm	0.25 mm
Espesor de película	0.1 µm	0.25 µm	0.25 µm
Temp máxima	420 °C	360 °C	390 °C
Marca	QUADREX	Hewlett Packard	QUADREX

Tabla 3.1.2 Características de las columnas



## 3.2 CROMATOGRAFÍA DE GASES CAPILAR DE ALTA TEMPERATURA (CGCAT)

La cromatografía de gases capilar de alta temperatura se evaluó como técnica de separación y análisis de etoxiquin a partir de una muestra, ya que es una técnica que permite realizar separaciones eficientes de muestras a temperaturas poco convencionales de hasta 400°C; para ello, se evaluaron tres columnas de alta temperatura con fase estacionaria de diferente polaridad, así como diferentes programas de temperatura para una separación y análisis eficiente de etoxiquin y de la muestra.

### Preparación de estándar de etoxiquin

Se pesaron alrededor de 50 mg de estándar de etoxiquin (93.5% de pureza) en una balanza analítica y se llevó al aforo con tolueno en un matraz volumétrico de 10 mL. De esta disolución se tomaron 50  $\mu$ L y se llevó a un volumen de 10 mL para tener así una concentración aproximada a 25 ppm de etoxiquin.

### Preparación de muestra

Se pesaron alrededor de 1.5 g de muestra en una balanza analítica y se llevaron al aforo con tolueno en un matraz volumétrico de 10 mL.

#### 3.2.1 Determinación del programa de temperaturas

Para la determinación del programa de temperaturas, primero se realizó la evaluación de tres columnas de alta temperatura de diferente polaridad (ver tabla 3.2.1). En todos los casos, cuando se colocó la columna en el cromatógrafo de gases, se corrió un blanco de columna, así como la compensación de las mismas; se inyectó 1  $\mu$ L de las disoluciones preparadas de estándar de etoxiquin y de la muestra al cromatógrafo de gases para su análisis a las mismas condiciones de temperatura.





Se utilizó la columna de 50% fenilmetil silicón para la evaluación de las condiciones óptimas de temperatura para la separación cromatográfica eficiente de los componentes de la muestra; en todos los casos se realizó la compensación de la columna antes del análisis; las rampas evaluadas fueron 30, 20, 10 y 2 °C/min y las temperaturas iniciales fueron 50, 60, 70 y 100°C, no se realizaron modificaciones en las demás condiciones de temperatura. Se inyectó 1 µL de las disoluciones preparadas de estándar de etoxiquín y de la muestra al cromatógrafo de gases para su análisis a las mismas condiciones de trabajo.

### 3.2.2 Cuantificación de etoxiquín por CGCAT

Para la cuantificación de etoxiquín, se preparó una curva de calibración a partir de la disolución de estándar de etoxiquín; las disoluciones utilizadas se muestran en la tabla 3.2.1; las condiciones del análisis por CGCAT fueron las que se establecieron de acuerdo a las evaluaciones previas.

Disolución	Volumen de ETQ	Aforo con Tolueno	Concentración ETQ
1	0.001 mL	2 mL	2.5 ppm
2	0.002 mL	2 mL	5.0 ppm
3	0.004 mL	2 mL	10.1 ppm
4	0.006 mL	2 mL	15.1 ppm
5	0.008 mL	2 mL	20.2 ppm
6	0.012 mL	2 mL	30.3 ppm
7	0.016 mL	2 mL	40.4 ppm
8	0.020 mL	2 mL	50.6 ppm

Tabla 3.2.1 Preparación de disoluciones de etoxiquín para curva de calibración (VIDE SUPRA)

De éstas disoluciones se inyectó 1 µL al cromatógrafo de gases y se elaboró la curva de calibración; de la disolución preparada de muestra se inyectó 1 µL al cromatógrafo de gases y se cuantificó el contenido de etoxiquín interpolando el valor obtenido.



### 3.3 EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO

La finalidad de esta etapa es evaluar la técnica de extracción líquido-líquido como técnica alternativa para la extracción y separación de etoxiquin a partir de una muestra para su análisis por cromatografía de gases, para ello se utilizaron y evaluaron las metodologías informadas en la literatura para el caso especial de un producto de uso veterinario.

#### Preparación de estándar de etoxiquin

Se pesaron alrededor de 50 mg de estándar de etoxiquin (93.5% de pureza) en una balanza analítica y se llevó al aforo con etanol anhidro en un matraz volumétrico de 25 mL para así tener una concentración aproximada a 2000 ppm.

Para los análisis, en todos los casos se tomaron 500  $\mu$ L de esta disolución y al final del tratamiento las disoluciones obtenidas se llevó al aforo con isoctano en matraces volumétricos de 5 mL para así tener una concentración aproximada a 200 ppm.

#### Condiciones cromatográficas

Para el análisis por CGC se utilizó un cromatógrafo de gases equipado con un inyector “on-column”, detector FID y un integrador. La columna utilizada fue de 5% fenil metil silición 30 m x 0.25 mm x 0.25  $\mu$ m.

Las condiciones de trabajo para el análisis por cromatografía de gases capilar se muestran en la tabla 3.3.1:

	Temperatura (°C)	Rampa (°C/min)	Tiempo (min)
<b>Inicial</b>	120		0.5
		20	
<b>Final</b>	300		10
<b>Detector</b>	300		
<b>Total</b>			19.5

Tabla 3.3.1 Condiciones de temperatura para el análisis de etoxiquin por extracción L-L.





### 3.3.1 Evaluación de técnicas de extracción por disolventes informadas en la literatura

#### 3.3.1.1 Extracción líquido-líquido informada en *J. of the A.O.A.C.*, 1964

La extracción se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento descrito en la literatura y se realizó de la misma forma para 500  $\mu\text{L}$  de disolución de estándar de etoxiquin que para la muestra problema. Se pesó alrededor de 1 g de muestra que se colocó en un matraz con 5 mL de metanol, se agitó vigorosamente la mezcla y se dejó reposar durante 5 minutos. El contenido se decantó en un matraz volumétrico de 25 mL y el residuo se reconstituyó con 5 mL más de metanol, el proceso se repitió tres veces para aumentar el rendimiento de la extracción. Las disoluciones de metanol que se obtuvieron se combinaron y se llevaron al aforo con el mismo disolvente; de ésta disolución se tomó una alícuota de 3 mL que se transfirió a un embudo de separación al cual se le adicionó previamente 10 mL de agua destilada, se mezclaron y agitaron perfectamente. Se adicionaron 5 mL de hexano al embudo de separación, se agitó moderadamente durante 1 minuto y se dejó reposar para que ocurriera la separación de las fases. Se drenó lentamente la fase acuosa y la fase hexánica se pasó a un segundo embudo de separación; se regresó la fase acuosa-metanólica al primer embudo y se realizó la extracción con 2.5 mL hexano dos veces más. Los extractos hexánicos obtenidos se combinaron, se les adicionaron 5 mL de agua destilada y se agitó vigorosamente en un vórtex; la fase acuosa obtenida se desechó; a la fase hexánica se le eliminó la humedad con sulfato de sodio anhidro y se recuperó en un matraz volumétrico de 10 mL que se llevó al aforo con hexano. De ésta disolución se inyectó 1  $\mu\text{L}$  en el cromatógrafo de gases para su análisis.

#### 3.3.1.2 Extracción líquido-líquido informada en *J. of the A.O.A.C.*, 1966

La extracción se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento descrito en la literatura y se realizó de la misma forma para 500  $\mu\text{L}$  de disolución de estándar de etoxiquin y para la muestra problema. Se pesó alrededor de 1 g de muestra que se colocó en un matraz con 10 mL de isooctano, la mezcla se agitó vigorosamente durante 3 minutos y se dejó reposar; el sobrenadante obtenido se pasó a un matraz de separación, el proceso se repitió una vez más con los residuos y otra porción de 10 mL de isooctano.





Las disoluciones se combinaron y transfirieron a un embudo de separación adicionando 5 mL de ácido sulfúrico 0.1 M, se agitó durante 1 minuto. Los extractos acuosos que se obtuvieron se combinaron con 1 mL de hidróxido de sodio 1 M, y se realizó la extracción con dos porciones de 5 mL de isoctano. Los extractos resultantes se combinaron y se eliminó la humedad con sulfato de sodio anhidro. La disolución se evaporó hasta un volumen de 5 mL y de ésta disolución se inyectó 1  $\mu$ L en el cromatógrafo de gases para su análisis.

#### **3.3.1.3 Extracción líquido-líquido informada en *Agric. Food Chem.*, 1963**

La extracción se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento descrito en la literatura y se realizó de la misma forma para el caso de 500  $\mu$ L de disolución de estándar de etoxiquin y para la muestra problema. Se pesaron alrededor de 2 g de la muestra que se colocaron en un matraz de pera con 50 mL de etanol, la disolución se puso en un baño maría y en reflujo por 30 minutos. Pasado el tiempo de reflujo, se agregaron a la mezcla de reacción 2 g de hidróxido de potasio y se continuó el reflujo durante 1 hora. La disolución obtenida se pasó a un embudo de separación y se realizó la extracción con tres porciones de 20 mL de isoctano; la fase acuosa se desechó y los extractos de isoctano se combinaron en otro embudo de separación, éstos se lavaron con agua destilada hasta pH neutro y se extraen con cuatro porciones de 10 mL de ácido clorhídrico 0.05 M. Los extractos acuosos se separaron y neutralizaron con disolución concentrada de hidróxido de potasio; la disolución resultante se extrae con tres porciones de 10 mL de isoctano. Al extracto orgánico resultante se le eliminó la humedad con sulfato de sodio anhidro, de ésta disolución se inyectó 1  $\mu$ L en el cromatógrafo de gases para su análisis.

#### **3.3.1.4 Extracción líquido-líquido informada en *Agric. Food Chem.*, 1963**

La extracción se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento descrito en la literatura y se realizó de la misma forma para el caso de 500  $\mu$ L de disolución de estándar de etoxiquin y para la muestra problema. Se pesaron alrededor de 1 g de muestra que se colocaron en un matraz con 250 mL de isoctano, de esta disolución se tomó una alícuota de 100 mL que se transfirió a un embudo de separación.





Se realizó la extracción con tres porciones de 30 mL de ácido clorhídrico 1 M para aumentar el rendimiento de la extracción. Las fases acuosas se separaron en cada extracción y se combinaron en un matraz volumétrico de 100 mL que se llevó al aforo con ácido clorhídrico 1 M; de esta disolución se tomó 1 mL en una celda de cuarzo de longitud de paso óptico de 1 cm para la determinación por espectrofotometría de UV-visible a una longitud de onda de 296 nm. El resto de la disolución se llevó a pH neutro con disolución concentrada de hidróxido de potasio y se le realizó una extracción con 10 mL de diclorometano, de ésta disolución se inyectó 1  $\mu$ L en el cromatógrafo de gases, se realizó la identificación de etoxiquin por CG-EM para su comparación con los resultados de UV-visible.

### 3.3.2 Optimización de la técnica de extracción por disolventes de etoxiquin a partir de una muestra

La finalidad de esta etapa es optimizar la técnica de extracción por disolventes elegida para la extracción de etoxiquin a partir de una muestra, para obtener un mayor rendimiento de extracción con el menor gasto posible de disolventes y reactivos; la optimización se realizó en todos los casos con disolución de estándar de etoxiquin. Se utilizó para la optimización el método modificado de extracción por disolventes para una mejor manipulación de la muestra y menor consumo de reactivos.

#### Preparación de estándar externo de indol

Se pesaron alrededor de 25 mg de indol en una balanza analítica y se llevó al aforo con isooctano en un matraz volumétrico de 10 mL. De ésta disolución se tomaron 100  $\mu$ L y se adicionaron a todas las muestras analizadas por cromatografía de gases contenidas en un volumen de 5 mL para así tener una concentración aproximada a 50 ppm de estándar interno.



### Preparación de disolución de ácido clorhídrico

Se tomaron 2 mL de ácido clorhídrico concentrado y se transfirieron en un matraz volumétrico de 25 mL que se llevó al aforo con agua destilada para así tener una concentración de ácido clorhídrico aproximada a 1 M. Para la preparación de las diluciones se tomaron los volúmenes que se muestran en la tabla 3.3.2

Concentración de HCl	Volumen de HCl 1M	Volumen final
<b>1 M</b>	25 mL	25 mL
<b>0.1 M</b>	2.5 mL	25 mL
<b>0.01 M</b>	0.25 mL	25 mL
<b>0.001 M</b>	0.025mL	25 mL

Tabla 3.3.2 Concentraciones de ácido clorhídrico preparadas a partir de concentración 1M

#### **3.3.2.1 Modificación al proceso de extracción por disolventes.**

Se realizó un escalamiento de los volúmenes recomendados en la literatura, se tomaron 500  $\mu$ L de disolución estándar de etoxiquin y se colocaron en un embudo de separación con 10 mL de isoctano; las extracciones en todos los casos se realizaron con 5 mL de extractante, las fracciones obtenidas se colectaron en matraces volumétricos de 5 mL que se llevó al aforo con el disolvente adecuado. De éstas disoluciones se inyectó 1  $\mu$ L en el cromatógrafo de gases para su análisis.

#### **3.3.2.2 Efecto de la concentración de ácido clorhídrico sobre la extracción**

En un embudo de separación de 60 mL se colocaron 500  $\mu$ L de disolución estándar de etoxiquin junto con 10 mL de isoctano, se agita vigorosamente y se realizaron las extracciones necesarias con 1 mL de ácido clorhídrico de cada concentración hasta no obtener señales por CGC. La fracción de isoctano residual se colectó en un matraz volumétrico de 5 mL y se llevó al aforo con isoctano, de ésta disolución se inyectó 1  $\mu$ L en el cromatógrafo de gases. Las concentraciones de ácido clorhídrico que se utilizaron son las que se muestran en la tabla 3.3.2.







Para el análisis de datos se tomó en cuenta como 100% el área que se obtiene para 500  $\mu\text{L}$  de disolución de etoxiquin en 5 mL de isooctano.

### 3.3.2.3 Efecto del pH sobre la extracción

En un embudo de separación de 60 mL se colocaron 500  $\mu\text{L}$  de disolución estándar de etoxiquin junto con 10 mL de isooctano, se agitó vigorosamente y se realizó una extracción con 2 mL de ácido clorhídrico 1 M. La fracción acuosa se colectó en un matraz erlenmeyer de 25 mL y con disolución de hidróxido de potasio de concentración 1M se ajustó a pH cercano a 7, 10, 12 y 14 midiendo con un potenciómetro con electrodo de vidrio previamente calibrado. A cada disolución obtenida se le realizan dos extracciones con 5 mL de isooctano cada una; las fracciones de isooctano resultantes se colectaron juntas en un matraz volumétrico de 5 mL a los que se les adicionó 100  $\mu\text{L}$  de disolución de estándar externo y se llevó al aforo con isooctano, de éstas disoluciones se inyectó 1  $\mu\text{L}$  en el cromatógrafo de gases.

### 3.3.2.4 Efecto del disolvente sobre la extracción

En un embudo de separación de 60 mL se colocaron 500  $\mu\text{L}$  de disolución estándar de etoxiquin junto con 10 mL de isooctano, se agitó vigorosamente y se realizó una extracción con 2 mL de ácido clorhídrico 1 M, la fracción acuosa se llevó a un pH aproximadamente de 10 con 200 mg de bicarbonato de sodio. A esta disolución se le realizaron las extracciones necesarias con 1 mL de disolvente cada una hasta no obtener señales por CGC. Las fracciones de disolvente resultantes se colectaron por separado en matraces volumétricos de 5 mL a los que se adicionó 100  $\mu\text{L}$  de disolución de estándar externo y se llevó al aforo con el mismo disolvente, de éstas disoluciones se inyectó 1  $\mu\text{L}$  en el cromatógrafo de gases. Los disolventes que se utilizaron para la extracción de etoxiquin fueron isooctano, tolueno, diclorometano, hexano y trietilamina.





### 3.3.3 Determinación de Parámetros de Calidad

La finalidad de esta etapa es determinar los parámetros de calidad como son la linealidad, reproducibilidad, límite de detección y % de recobro para evaluar la confiabilidad de la metodología analítica optimizada que se propone para la extracción de etoxiquin de una muestra y su determinación cuantitativa por CGC, para ello se realizaron las pruebas necesarias con el estándar de etoxiquin y una muestra en estudio.

#### Preparación de estándar de etoxiquin

Se pesaron alrededor de 20 mg de estándar de etoxiquin (93.5% de pureza) en una balanza analítica y se llevó al aforo con acetona en un matraz volumétrico de 5 mL. De esta disolución se tomaron 10  $\mu$ L y se llevó a un volumen de 5 mL con el mismo disolvente para tener así una concentración aproximada a 9 ppm de etoxiquin

#### Preparación de muestra

Se pesó alrededor de 1 g de muestra en una balanza analítica y se disolvió con una mezcla de hexano-tolueno-acetona 2:1:1 para la mejor disolución de ésta, se agitó vigorosamente durante 4 minutos y se centrifugó, el contenido se decantó en un matraz aforado de 100 mL; el proceso se repitió 5 veces y al final se llevó al aforo con la mezcla de disolventes. De esta disolución se tomó 4 mL para realizar las determinaciones.

#### Preparación de disolución de ácido clorhídrico 1 M

Se tomaron 2 mL de ácido clorhídrico concentrado y se transfirieron en un matraz volumétrico de 25 mL que se llevó al aforo con agua destilada para así tener una concentración de ácido clorhídrico aproximada a 1 M.





### Preparación de disolución de estándar interno

Se pesaron alrededor de 20 mg de estándar de xylocaína en una balanza analítica y se llevó al aforo con disolución de ácido clorhídrico 1 M en un matraz volumétrico de 5 mL. De esta disolución se tomaron 500  $\mu\text{L}$  y se llevaron a un volumen de 5 mL con la misma disolución de ácido clorhídrico, para las determinaciones se adicionaron 5  $\mu\text{L}$  de esta disolución para tener así una concentración aproximada de 2 ppm de estándar interno en las muestras analizadas por CGC.

### Preparación de disolución de trietilamina

Se tomaron 3 mL de trietilamina y se transfirieron en un matraz volumétrico de 25 mL que se llevó al aforo con hexano para así tener una concentración aproximada a 1 M.

### Condiciones cromatográficas

Para el análisis por CGC se utilizó un cromatógrafo de gases equipado con un inyector "on-column", detector FID y un integrador. La columna utilizada fue de 5% fenil metil silicón 30 m x 0.25 mm x 0.25  $\mu\text{m}$ .

Las condiciones de trabajo para el análisis por cromatografía de gases capilar se muestran en la tabla 3.3.3

	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	Rampa ( $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ )	Tiempo (min)
<b>Inicial</b>	50		0.5
		20	
<b>Final</b>	300		1
<b>Detector</b>	300		
<b>Final</b>			14

Tabla 3.3.3 Condiciones de temperatura para el análisis de etoixiquin





### 3.3.3.1 Determinación de la linealidad

#### 3.3.3.1.1 De la determinación cuantitativa por CGC

Para la determinación de la linealidad de las determinaciones cuantitativas de la metodología propuesta, se prepararon disoluciones de estándar de etoxiquin en un intervalo de concentraciones que van desde 9 ppb hasta 4.5 ppm realizando las diluciones necesarias a partir de la disolución de estándar; de cada una de éstas se inyectó 1  $\mu\text{L}$  al cromatógrafo de gases para su análisis y con los datos obtenidos se elaboró la curva de calibración. La preparación de las disoluciones se muestra en la tabla 3.3.4

Alicuota de ETQ	Aforo con TEA	Estándar interno	Concentración ETQ
1 $\mu\text{L}$	1 mL	5 $\mu\text{L}$	0.009 ppm
3 $\mu\text{L}$	1 mL	5 $\mu\text{L}$	0.027 ppm
5 $\mu\text{L}$	1 mL	5 $\mu\text{L}$	0.045 ppm
10 $\mu\text{L}$	1 mL	5 $\mu\text{L}$	0.090 ppm
30 $\mu\text{L}$	1 mL	5 $\mu\text{L}$	0.270 ppm
50 $\mu\text{L}$	1 mL	5 $\mu\text{L}$	0.450 ppm
100 $\mu\text{L}$	1 mL	5 $\mu\text{L}$	0.900 ppm
200 $\mu\text{L}$	1 mL	5 $\mu\text{L}$	1.800 ppm
300 $\mu\text{L}$	1 mL	5 $\mu\text{L}$	2.700 ppm
400 $\mu\text{L}$	1 mL	5 $\mu\text{L}$	3.600 ppm
500 $\mu\text{L}$	1 mL	5 $\mu\text{L}$	4.500 ppm

Tabla 3.3.4 Preparación de disoluciones de etoxiquin para la evaluación de la linealidad de las determinaciones cuantitativas (VIDE SUPRA)

#### 3.3.3.1.2 De la metodología analítica propuesta

Para la determinación de la linealidad de la metodología de extracción propuesta, se tomaron 4 mL de la disolución de muestra preparada y se adicionó con disolución de estándar de etoxiquin, las adiciones se muestran en la tabla 3.3.5.





Se realizó la extracción conforme a la metodología propuesta en el presente trabajo y de las disoluciones obtenidas se inyectó 1  $\mu\text{L}$  al cromatógrafo de gases para su análisis. Con los datos obtenidos se elaboró la curva de adiciones patrón. El intervalo de concentraciones de etoxiquin adicionado fue de 0.450 ppm a 3.6 ppm

Alicuota de ETQ	Muestra	Estándar interno	Concentración ETQ
50 $\mu\text{L}$	4 mL	5 $\mu\text{L}$	0.45 ppm
100 $\mu\text{L}$	4 mL	5 $\mu\text{L}$	0.90 ppm
200 $\mu\text{L}$	4 mL	5 $\mu\text{L}$	1.80 ppm
300 $\mu\text{L}$	4 mL	5 $\mu\text{L}$	2.70 ppm
400 $\mu\text{L}$	4 mL	5 $\mu\text{L}$	3.60 ppm

Tabla 3.3.5 Preparación de disoluciones de etoxiquin para la evaluación de la linealidad de la metodología propuesta  
(VIDE SUPRA)

### 3.3.3.2 Determinación del límite de detección

Para la determinación del límite de detección, se tomaron en cuenta los resultados en el intervalo de 9 ppb a 90 ppb de etoxiquin que se utilizó en la elaboración de la curva de calibración para la determinación de la linealidad de las determinaciones cuantitativas. Adicionalmente se realizó una dilución 1 en 10 con TEA de la disolución de etoxiquin de 9 ppb y se inyectó 1  $\mu\text{L}$  al cromatógrafo de gases para comprobar el valor del límite de detección calculado.

### 3.3.3.3 Determinación de la reproducibilidad

Para la determinación de la reproducibilidad de la metodología de extracción propuesta, se tomaron 4 mL de la disolución de muestra preparada, se realizó la extracción conforme a la metodología propuesta en el presente trabajo, de la disolución obtenida se inyectó 1  $\mu\text{L}$  al cromatógrafo de gases para su análisis; el proceso se repitió por sextuplicado y los datos se trataron estadísticamente para determinar el coeficiente de variación.





### 3.3.3.4 Determinación del porcentaje de recobro

Para su determinación se tomaron en cuenta y se relacionaron los resultados obtenidos de la curva de calibración para la determinación de la linealidad de la determinación cuantitativa y la linealidad de la metodología propuesta, en el intervalo de 0.45 ppm a 3.6 ppm.

### 3.3.4 Análisis de muestras

Ya establecidos los parámetros que evalúan la confiabilidad de la metodología analítica de extracción de etoxiquin, se continúa con la determinación cuantitativa del contenido de etoxiquin presente en tres lotes de la muestra proporcionada con la metodología de extracción propuesta en el presente trabajo.

Para el análisis por triplicado de los tres lotes de muestra en estudio, se pesaron aproximadamente 100 mg de muestra en una balanza analítica y se trataron conforme a la metodología propuesta anteriormente, las disoluciones utilizadas fueron las mismas que en el caso de la evaluación de los parámetros estadísticos de la metodología. La determinación cuantitativa se realizó por análisis de los resultados en la curva de calibración y la identificación del etoxiquin presente en las muestras se comprobó por CGC-EM.

## 3.4 EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (EFS)

La finalidad de esta etapa es evaluar la EFS como técnica alternativa para la separación y extracción de etoxiquin a partir de una muestra para su posterior análisis por CGC, para ello se utilizaron y se evaluaron dos fases comerciales: iso-propilamino ( $-NH_2$ ) como fase normal, octadecano ( $C_{18}$ ) como fase inversa. Los cartuchos empleados fueron de capacidad de muestra 3 mL (500 mg).





### Preparación de estándar de etoxiquin

Se pesaron alrededor de 50 mg de estándar de etoxiquin (93.5% de pureza) en una balanza analítica y se llevó al aforo con tolueno en un matraz volumétrico de 25 mL. De esta disolución se tomó 50  $\mu$ L y se llevó a un volumen de 10 mL para tener así una concentración aproximada a 10 ppm de etoxiquin.

### Preparación de muestra

Se pesaron alrededor de 50 mg de muestra en una balanza analítica y se llevó al aforo con tolueno en un matraz volumétrico de 25 mL. De esta disolución se tomó 1 mL y se llevó a un volumen de 10 mL para tener así una concentración aproximada a 200 ppm de muestra.

### Condiciones cromatográficas

Para el análisis por CGC se utilizó un cromatógrafo de gases equipado con un inyector "on-column", detector FID y un integrador. La columna utilizada fue de 50% fenilmetil silicón, 15 m x 0.25 mm x 0.25  $\mu$ m.

Las condiciones de trabajo para el análisis por cromatografía de gases capilar se muestran en la tabla 3.4.1

	Temperatura (°C)	Rampa (°C/min)	Tiempo (min)
<b>Inicial</b>	60		0.5
		20	
<b>Final</b>	380		10
<b>Total</b>			26.5

Tabla 3.4.1 Condiciones de temperatura para el análisis de etoxiquin por EFS.

La temperatura del detector se mantuvo a 380 °C en todos los análisis.





### 3.4.1 Evaluación de fase amino, $-\text{NH}_2$ (fase normal)

Todos los cartuchos se acondicionaron previamente con 2 mL de hexano anhidro, el volumen adicionado de disolución estándar de etoxiquin y de muestra en todos los casos fue de 1 mL, los lavados se hicieron con hexano anhidro y la elución final de los compuestos se realizó con metanol.

#### 3.4.1.1 Estimación de volúmenes de disolventes para el lavado y elución del cartucho

Se hicieron adiciones de 1 mL de hexano para el lavado del cartucho, se colectaron por separado fracciones de 1 mL en frascos viales, se evaporó hasta sequedad con flujo de nitrógeno gas y se reconstituyó hasta un volumen final de 0.2 mL con hexano; de éstas disoluciones se inyectó 1  $\mu\text{L}$  en el cromatógrafo de gases para su análisis.

Los lavados de hexano se realizaron hasta obtener un registro sin señales por CGC; a partir de ese momento se realizaron adiciones de 1 mL de metanol, se colectaron nuevamente por separado fracciones de 1 mL en frascos viales, se evaporó hasta sequedad con flujo de nitrógeno gas y se reconstituyó hasta un volumen final de 0.2 mL con hexano; de éstas disoluciones se inyectó 1  $\mu\text{L}$  en el cromatógrafo de gases para su análisis; la elución con metanol se realizó hasta obtener un registro sin señales por CGC.

#### 3.4.1.1.1 Análisis cuantitativo de etoxiquin presente en la muestra con los volúmenes de disolventes estimados

Se hicieron adiciones de 1 mL de hexano hasta completar 6 mL para el lavado del cartucho y adiciones de 1 mL de metanol hasta completar 6 mL para la elución. Se colectaron por separado las fracciones de 1 mL en frascos viales, se evaporó hasta sequedad con flujo de nitrógeno gas y se reconstituyó hasta un volumen final de 0.2 mL con hexano; de éstas disoluciones se inyectó 1  $\mu\text{L}$  en el cromatógrafo de gases para su análisis.







### 3.4.1.2 Evaluación de mezclas de hexano y metanol para la separación de etoxiquin

Para realizar los lavados del cartucho se prepararon las mezclas de disolventes a diferentes proporciones para realizar los lavados indicados en la tabla 3.4.2

Lavado	Metanol	Hexano	Volumen final
1	0.05 mL	1.95 mL	2 mL
2	0.10 mL	1.9 mL	2 mL
3	0.20 mL	1.8 mL	2 mL
4	0.30 mL	1.7 mL	2 mL
5	0.5 mL	1.5 mL	2 mL
6	1.0 mL	1.0 mL	2 mL
7	2.0 mL	0.0 mL	2 mL

Tabla 3.4.2. Preparación de mezclas de metanol-hexano para la separación de etoxiquin

Se adicionaron 2 mL de cada una de las mezclas de disolventes preparadas al cartucho para su lavado, se colectaron por separado fracciones de 2 mL en frascos viales, se evaporó hasta sequedad con flujo de nitrógeno gas y se reconstituyó hasta un volumen final de 0.2 mL con hexano; de éstas disoluciones se inyectó 1  $\mu$ L en el cromatógrafo de gases para su análisis.

### 3.4.2. Evaluación de fase octadecil, $C_{18}$ (fase inversa)

Todos los cartuchos se acondicionaron previamente con 2 mL de metanol, el volumen adicionado de disolución estándar de etoxiquin y de muestra en todos lo casos fue de 1 mL; los lavados se hicieron con metanol y la elución final de los compuestos se realizó con hexano anhidro.



### 3.4.2.1 Estimación de volúmenes de disolventes para el lavado y elución del cartucho

Se hicieron adiciones de 1 mL de metanol para el lavado del cartucho, se colectaron por separado fracciones de 1 mL en frascos viales, se evaporó hasta sequedad con flujo de nitrógeno gas y se reconstituyó hasta un volumen final de 0.2 mL con hexano; de éstas disoluciones se inyectó 1  $\mu$ L en el cromatógrafo de gases para su análisis.

Los lavados con metanol se realizaron hasta obtener un registro sin señales por CGC; a partir de ese momento se realizaron adiciones de 1 mL de hexano anhidro, se colectaron nuevamente por separado fracciones de 1 mL en frascos viales, se evaporó hasta sequedad con flujo de nitrógeno gas y se reconstituyó hasta un volumen final de 0.2 mL con hexano; de éstas disoluciones se inyectó 1  $\mu$ L en el cromatógrafo de gases para su análisis; la elución con hexano anhidro se realizó hasta obtener un registro sin señales por CGC.

#### 3.4.2.1.1 Análisis cuantitativo de etoxiquin presente en la muestra con los volúmenes de disolventes estimados.

Se hicieron adiciones de 1 mL de metanol hasta completar 6 mL para el lavado del cartucho y adiciones de 1 mL de hexano anhidro hasta completar 3 mL para la elución. Se colectaron por separado las fracciones de 1 mL en frascos viales, se evaporó hasta sequedad con flujo de nitrógeno gas y se reconstituyó hasta un volumen final de 0.2 mL con hexano; de éstas disoluciones se inyectó 1  $\mu$ L en el cromatógrafo de gases para su análisis.

#### 3.4.3 Estudios preliminares con cartuchos OASIS (fase inversa)

Para el estudio, el cartucho se acondicionó previamente con 2 mL de metanol y se estabilizó con 2 mL de agua destilada. Se adicionaron 50  $\mu$ L de disolución de estándar de etoxiquin y 100 mg de muestra disueltos en 1 mL de la mezcla de disolventes que se propone para la metodología analítica propuesta respectivamente.





El lavado del cartucho se realizó con 2 mL de disolución de ácido clorhídrico 1 M y la fracción colectada (acuosa) se trató con 200 mg de bicarbonato de sodio; a ésta fracción acuosa se le realizó una extracción con 1 mL de disolución de TEA; de ésta fracción, se inyectó 1  $\mu$ L al cromatógrafo de gases para su análisis. \*Nota: Las disoluciones que se utilizaron para el estudio fueron las mismas que se prepararon para la determinación de los parámetros de calidad (Ver inciso 3.3.3).

Las condiciones cromatográficas que se utilizaron fueron las mismas que las establecidas para la determinación de los parámetros de calidad con la única variante que la columna en este caso fue de 65 % fenil metil silicón (QUADREX) de 30 m x 0.32 mm x 0.25  $\mu$ m, con  $T_{max} = 320$  °C.

En el siguiente capítulo se presentan y discuten los resultados obtenidos de todos los estudios realizados.



# **Capítulo 4**

## **Resultados y Discusión**



## 4.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el siguiente capítulo se presentan los resultados del estudio y evaluación de las tres técnicas de separación y extracción, la propuesta de una metodología analítica y su optimización, así como su aplicación para la determinación cuantitativa de etoxiquin en muestras reales.

### 4.1 CROMATOGRAFÍA DE GASES DE ALTA TEMPERATURA (CGCAT)

Para la evaluación de la CAT como técnica de separación de etoxiquin de una muestra, es necesario el estudio previo de los parámetros cromatográficos óptimos como el tipo de columna y programa de temperatura para lograr así una separación eficiente y poder realizar la determinación cuantitativa de etoxiquin en la muestra. En la siguiente sección se presentan los resultados de los estudios y la determinación cuantitativa de etoxiquin por CAT.

#### 4.1.1 Determinación del programa de temperaturas

Para la evaluación de CAT como técnica de separación del etoxiquin a partir de una muestra, lo primero que se realizó, fue la selección de la columna de alta temperatura que permitiera obtener picos cromatográficos definidos, resueltos y de forma adecuada de los componentes presentes en la muestra. Se evaluaron tres columnas de alta temperatura de distinta polaridad (ver tabla 3.1.2); el estudio de las columnas se realizó utilizando el mismo programa de temperatura para comparar los resultados con base en el número de picos cromatográficos con resolución adecuada que se obtienen de la inyección de la muestra en estudio. Se pudo observar que la columna de polaridad intermedia y la polar presentaron los mejores resultados y además son similares, los picos cromatográficos fueron más definidos debido a que las fases estacionarias presentan un cierto grado de polaridad por la presencia de grupos fenilos y son más selectivas que la fase no polar, lo que se traduce en la elución adecuada de los analitos presentes en la muestra.





De acuerdo a los resultados, se decidió utilizar la columna más polar (Ultra Alloy) ya que presenta mejor resolución de los componentes de la muestra; después se hizo la optimización del programa de temperatura, ajustando parámetros como la velocidad de calentamiento del horno y la temperatura inicial del análisis. La velocidad en el incremento de la temperatura del horno es de vital importancia en un análisis cromatográfico debido a que de esta dependen la resolución y el tiempo de análisis. La evaluación se realizó con velocidades de calentamiento de 30, 20, 10, 5 y 2 °C/min, con base en el número de picos cromatográficos resueltos que se obtuvieron de la inyección de la muestra en estudio.

Debido a que la muestra presenta una gran cantidad de componentes, en el caso de las rampas de 30, 20 y 10 °C/min, no se observó una separación adecuada de etoxiquin. Con la rampa de 5 °C/min se logró la separación del etoxiquin y los demás componentes presentes en la muestra, la rampa de 2 °C/min no ofrece ventajas significativas en cuanto a la separación; respecto al tiempo de análisis, fue de aproximadamente 70 a 100 minutos que es un tiempo excesivo para este tipo de análisis. De acuerdo a los resultados se decidió utilizar una rampa de 5 °C/min al inicio del análisis para así obtener una separación adecuada de etoxiquin y los demás componentes presentes en la muestra y una rampa de 20 °C/min en la parte final del análisis para así disminuir el tiempo de análisis hasta aproximadamente 48 minutos.

Con los valores de velocidad de calentamiento del horno de 5 y 20 °C/min se evaluó la temperatura inicial del análisis, ya que de esta depende el enfoque del disolvente, esto influye en la resolución y separación de los componentes presentes en una muestra, el estudio se realizó empleando temperaturas iniciales de 50, 60, 70 y 100 °C respectivamente.

Por encima de 70 °C los picos cromatográficos no presentaron el enfoque adecuado, al disminuir la temperatura a 50 °C se obtuvo una mejor resolución. En este caso el tiempo de análisis aumentó más o menos dos minutos aproximadamente. Tomando en cuenta los resultados obtenidos del estudio, el programa de temperatura que se recomienda para la separación de etoxiquin a partir de una muestra es el que se muestra en la tabla 4.1.1.





	Temperatura (°C)	Rampa (°C/min)	Tiempo (min)
<b>Inicial</b>	50		0.5
		5	
	200		0
		20	
<b>Final</b>	380		10
<b>Total</b>			49.5

Tabla 4.1.1. Programa de temperaturas recomendado para una adecuada separación cromatográfica

El programa de temperatura descrito tiene la desventaja de que el tiempo de análisis es largo; sin embargo, es con el que se obtuvo la mejor separación, aunque no del todo eficiente, de etoxiquin en la muestra en estudio. Las condiciones anteriores se evaluaron para su aplicación en análisis directos y la determinación cuantitativa de etoxiquin en la muestra.

#### 4.1.2 Cuantificación de etoxiquin por CGCAT

Para la cuantificación de etoxiquin a partir de la muestra, se inyectó en el cromatógrafo de gases 1  $\mu$ L de las soluciones preparadas (ver tabla 3.2.1), con las áreas obtenidas de las inyecciones, se trazó un gráfico de área en función de la concentración (curva de calibración) y se obtuvo su función de ajuste lineal. Los resultados de la curva de calibración se muestran a continuación en la figura 4.1.1



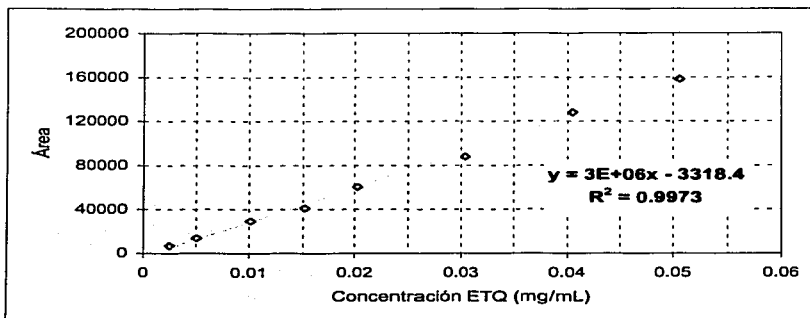


Figura 4.1.1 Curva de calibración de etoxiquin

Se realizó una prueba de hipótesis sobre la ordenada al origen (ver Anexo 1) para verificar si esta se puede considerar como a cero y se encontró que se acepta la hipótesis nula ( $H_0: b=0$ ), por lo que el valor de la ordenada al origen no es significativamente diferente de cero, entonces la pendiente de la función de ajuste corresponde al Factor de Respuesta (Fr) del etoxiquin y por lo tanto las determinaciones cuantitativas se pueden llevar a cabo con la relación:

$$\text{Respuesta} = \text{Fr} * \text{Concentración}$$

$$\text{Concentración} = \frac{\text{Respuesta}}{\text{Fr}} = \frac{\text{Área}}{\text{Fr}}$$

La muestra se inyecta tres veces y se obtiene un área promedio del pico que presentó el mismo tiempo de retención del estándar de etoxiquin, ésta área es de 9249 unidades, por lo que al relacionarla con el Fr obtenido se encontró que hay presentes 23 ppm de etoxiquin en la muestra en estudio.

La técnica de CGCAT se evaluó como una técnica de separación de etoxiquin a partir de la muestra; sin embargo, no fue la más adecuada debido a que el análisis resulta largo y la alta complejidad de la muestra impide la adecuada resolución del etoxiquin y los otros componentes de la muestra, por lo que resulta difícil la detección de etoxiquin y poco





confiable la cuantificación. Por lo anterior se plantea la necesidad de una extracción previa de la muestra para la separación de etoxiquin de los componentes que interfieren en la separación cromatográfica y su posterior cuantificación por CGC. A continuación se presentan los resultados obtenidos de la evaluación de la técnica de extracción líquido-líquido como técnica de separación y extracción previa de etoxiquin a partir de una muestra para su posterior análisis cuantitativo por CGC.

## 4.2 EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO

Se evaluaron las técnicas de extracción líquido-líquido publicadas para la separación de etoxiquin en alimentos, tejidos y diversos productos debido a que no se encontró información de técnicas para este tipo de aditivos con el fin de comprobar si la separación previa permitía el análisis cualitativo y cuantitativo comparable del etoxiquin. Después se optimizaron los parámetros críticos de la metodología de extracción líquido-líquido que arrojó mejores resultados, como son la naturaleza de los disolventes, la razón de volúmenes y la acidez, entre otros, que son necesarios para lograr una separación eficiente y porcentajes altos de recobro. Una vez establecidos los parámetros, se evaluó la determinación cuantitativa de etoxiquin en la muestra; todos los estudios se realizaron con el estándar de etoxiquin y la muestra.

El pH es uno de los parámetros más importantes que hay que controlar en una extracción líquido-líquido, ya que de este depende en gran parte la solubilidad de los analitos, y por ende, su concentración en una de las fases involucradas en la extracción. El etoxiquin, debido a su estructura presenta un equilibrio ácido-base; con un medio ácido acuoso se espera que pueda ser extraído selectiva y eficientemente de la muestra debido a la protonación de su grupo amino, para su posterior determinación cuantitativa por CGC. Los resultados se presentan en las siguientes secciones.





#### 4.2.1 Evaluación de técnicas de extracción por disolventes publicadas

##### 4.2.1.1 Extracción líquido-líquido informada en *J. of the A.O.A.C.*, 1964

La evaluación de la técnica de extracción líquido-líquido publicada en 1964 por Gordon R, Conkin R y Machlin L para el caso particular de alimentos en general de uso veterinario, se resume en una extracción de la muestra disuelta en metanol con tres porciones de hexano, de la fracción hexánica resultante se lleva a cabo el análisis por CGC. El estudio se realizó tanto con el estándar de etoquin, como con la muestra en estudio, los resultados en ambos casos se compararon para verificar la eficiencia de la separación de etoquin. Los resultados del estudio se muestran a continuación en la figuras 4.2.1a y b

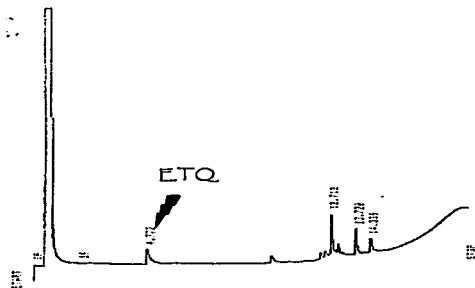


Figura 4.2.1 a Cromatograma del análisis por CGC del extracto de estándar de etoquin sometido al proceso de extracción líquido-líquido informado en *J. Of the A.O.A.C* 1964

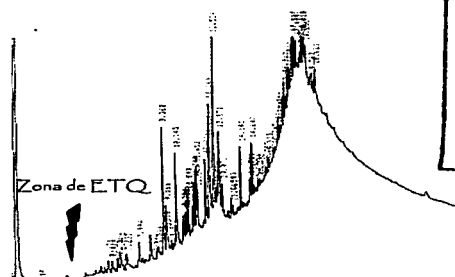


Figura 4.2.1 b Cromatograma del análisis por CGC del extracto de la muestra

TESIS CON  
FALTA DE ORIGEN

Del análisis por CGC de la fracción hexánica que resulta del tratamiento del estándar de etoquin se encontró que: a) se observó una señal muy pequeña por CGC en comparación de la esperada (si tomamos como referencia la señal que se obtiene del análisis por CGC de la misma cantidad de estándar de etoquin sin ser sometida al proceso de extracción), por lo que con hexano no se lleva a cabo la extracción eficiente del etoquin y b) la ineficiente extracción de etoquin con hexano se comprobó al realizar el análisis por CGC de la fracción sobrante de la extracción (metanol) en la cual se observó señal característica de etoquin.





Del análisis de la muestra se observó que cuando se decantó la disolución de metanol, quedó un producto insoluble colorido debido a que no se logró la solubilidad total; cuando se realizó el análisis por CGC de la fracción hexánica después de la extracción, no se observó señal característica de etoxiquin pero si señales debidas a otros componentes de la muestra.

Debido a los resultados obtenidos se asume que no ocurre la separación del etoxiquin de la muestra con las condiciones de extracción líquido-líquido publicadas por Gordon R, Conkin R y Machlin L, ya que se verificó por CGC que en la fracción de metanol residual, la presencia de etoxiquin en ambos casos: Cabe mencionar que con esta técnica de extracción se lograron eliminar algunas interferencias de la muestra que hacían poco confiable el análisis por CGC sin embargo no se obtuvo la separación eficiente de etoxiquin.

#### **4.2.1.2 Extracción líquido-líquido informada en *J. of the A.O.A.C.*, 1966**

La evaluación de la técnica de extracción líquido-líquido publicada en 1966 por Van Deren J y Jaworski E G para el caso particular de muestras de huevo, hígado y músculo de pollo, se resume en una extracción de la muestra disuelta en isoctano con una porción de ácido sulfúrico, que después se trata con disolución de hidróxido de sodio y se extrae nuevamente con dos porciones de isoctano, con la fracción en isoctano resultante se lleva a cabo el análisis por CGC. El estudio se realizó tanto con el estándar de etoxiquin, como con la muestra en estudio, los resultados en ambos casos se compararon para verificar la eficiencia de la separación de etoxiquin.

Se observó que con el tratamiento con ácido sulfúrico, ambas, (estándar de etoxiquin y muestra) se tornaron turbias y lechosas, lo que dificultó la separación de las fases nítidas y por lo tanto el manejo confiable de las muestras. Se intentó romper la turbidez del medio con la adición de agua, otros disolventes y disolución saturada de cloruro de sodio; sin embargo, no fue posible conseguir la separación de fases. Lo observado al manipular las muestras con ácido sulfúrico, permite asegurar que el procedimiento descrito por Van Deren y Jaworski no es el adecuado para la extracción de etoxiquin de la muestra en estudio.





#### 4.2.1.3 Extracción líquido-líquido informada en *Agric. Food Chem*, 1963

La evaluación de la técnica de extracción líquido-líquido publicada en 1963 por Choy T, alicino N J, Klein H C y Quattrone J J para el caso particular de alimentos de consumo humano y veterinario, se resume en una hidrólisis básica, a reflujo en baño maría durante 1 hora, de la muestra disuelta en etanol, seguida de repetidas extracciones con isooctano y ácido clorhídrico; para el análisis por CGC de la fracción acuosa resultante, fue necesario su tratamiento con disolución de hidróxido de potasio y una extracción con tres porciones de isooctano. El estudio se realizó tanto con el estándar de etoxiquin, como con la muestra en estudio; los resultados en ambos casos se compararon para verificar la eficiencia de la separación de etoxiquin y se muestran en las figuras 4.2.2 y 4.2.3.

Se observó que al retirar del baño maría la muestra disuelta en etanol, la disolución cristalina y al fondo del matraz un residuo de color blanco en mucho menor cantidad que en los casos anteriores; después de que se agregó el hidróxido de potasio la disolución se tornó turbia.

En la extracción con isooctano no se formaron las dos fases debido a que el etanol utilizado era anhidro por lo que se tuvieron que adicionar 10 mL de agua. La adición de agua incrementa la concentración de etoxiquin en la fase orgánica (isooctano) debido a que debe ocurrir una competencia entre la solubilidad del etoxiquin en el agua (< 1 ppm) y en etanol, dando como resultado la concentración del etoxiquin en el isooctano debido a su solubilidad en este; este fenómeno provoca que se necesiten más extracciones para obtener el mayor rendimiento posible; lo que implica un aumento en el tiempo de análisis y mayor consumo de disolventes (>100mL).

Después, se realizó la extracción con ácido clorhídrico en donde al agitar la mezcla, se observó la formación de una emulsión que se logró romper con calentamiento moderado o por adición de disolución saturada de cloruro de sodio; el número de extracciones necesarias que se tuvieron que realizar para no observar señal por CGC debida a etoxiquin fueron en promedio de hasta 10 y 6 extracciones respectivamente. Con respecto a éstos resultados se asume que la adición de disolución saturada de cloruro de sodio además de evitar la formación de la emulsión, hace fácil y confiable el manejo de la





muestra, y favorece la concentración de etoxiquin en la fase orgánica gracias al efecto salino y la solubilidad de este en la fase acuosa; el calentamiento puede favorecer reacciones de degradación del etoxiquin <sup>12</sup> que hacen poco confiable su cuantificación, por lo que se elimina la posibilidad del tratamientos con calor previo a su análisis cuantitativo.

Los siguientes procesos de la extracción no presentaron dificultades en el manejo de las muestras, el extracto final de la muestra presentó una coloración amarilla tenue característica. Los cromatogramas obtenidos del estándar de etoxiquin y la muestra se muestran en las figuras 4.2.2 y 4.2.3 respectivamente (Nota: la temperatura inicial se modificó en aproximadamente 5 °C en el caso del análisis por CGC del extracto de la muestra).

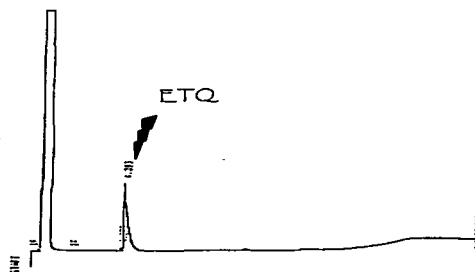


Figura 4.2.2 Cromatograma del análisis por CGC del extracto de estándar de etoxiquin sometido a proceso de extracción líquido-líquido informado en *Agric. Food. Chem.*, 1963

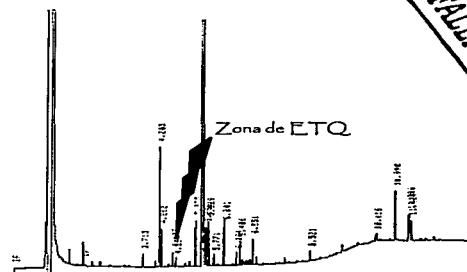


Figura 4.2.3 Cromatograma del análisis por CGC del extracto de una muestra

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Del análisis por CGC de los extractos se observó en el caso del estándar de etoxiquin una señal con tiempo de retención característico; en el análisis de la muestra se encontró una señal que coincide con el tiempo de retención del etoxiquin a las condiciones de trabajo y otras señales en la zona donde aparece el etoxiquin. Lo anterior sugiere que la técnica a pesar de lograr una extracción eficiente de etoxiquin, no elimina las interferencias de otros componentes de la muestra sobre todo, en la zona de interés, lo que podría radicar en una determinación poco confiable.





Debido a que el tiempo de retención de la señal de etoxiquin se modificó por un cambio en la temperatura inicial del análisis por CGC, se tuvo que comprobar su identidad por CGC-EM por la presencia de señales características de 154, 174, 202 y 217 m/z en ambos extractos (estándar de etoxiquin y muestra). Los resultados se muestran en las figuras 4.2.4 y 4.2.5 respectivamente.

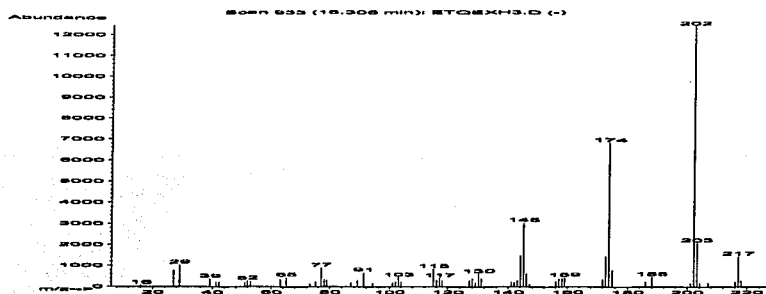


Figura 4.2.4 Espectro de masas del extracto de estándar de etoxiquin sometido al proceso de extracción publicado en Agric. Food. Chem 1963

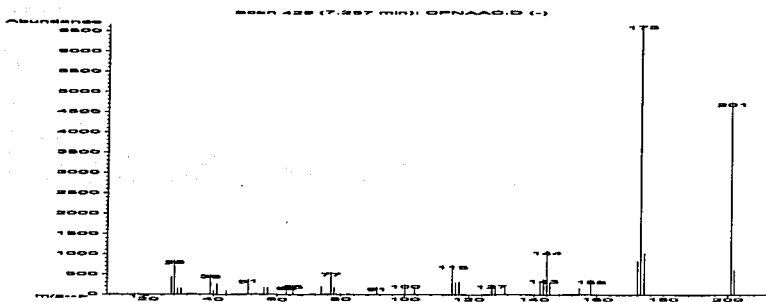


Figura 4.2.5 Espectro de masas del extracto de la muestra

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Se encontró que en el análisis por CGC-EM del extracto del estándar de etoxiquin, se observaron las señales de fragmentos característicos de etoxiquin 154, 174, 202 y 217 m/z y en las mismas abundancias en comparación con lo informado en la base de datos NIST 2.0 (Ver Anexo 2). En el caso del extracto de la muestra, la señal que se pensaba característica de etoxiquin se identificó como 2,4-dimetil-etoxiquinolina (etoxiquinolina) por sus señales en 115, 144, 173 201 m/z con las mismas abundancias relativas en comparación con el espectro publicado<sup>13</sup>; el compuesto identificado es un producto de degradación del etoxiquin, su formación se favorece por el calentamiento de etoxiquin <sup>12</sup> (220 °C aproximadamente) y presenta la misma actividad como antioxidante que el etoxiquin <sup>12,13</sup>. Si el calentamiento favorece la degradación de etoxiquin y por lo tanto la formación de la etoxiquinolina, entonces el mismo efecto se debe observar en el caso del análisis del estándar de etoxiquin; sin embargo, esto no ocurre, por lo que nos lleva a pensar que el etoxiquin no es incorporado al aditivo en estudio desde el inicio como tal o bien que la forma de almacenamiento de la muestra no fue el adecuado por lo que se ha degradado el etoxiquin presente.

Por los resultados obtenidos se decidió evaluar otra técnica de extracción líquido-líquido publicada que no incluya calentamiento de la muestra previo a su análisis por CGC, para así evitar la formación de productos de degradación que provoquen mayor complejidad a la muestra en estudio, pero que incluya en su proceso la extracción con ácido clorhídrico ya que con este se favorece la separación eficiente del etoxiquin en la muestra. Cabe mencionar que de acuerdo con los resultados, en los siguientes estudios se debe hacer referencia tanto del etoxiquin como de la etoxiquinolina presentes en la muestra en estudio.

#### **4.2.1.4 Extracción líquido-líquido informada en *Agric. Food Chem*, 1963**

La evaluación de la técnica de extracción líquido-líquido publicada en 1963 por Choy, Alicino, Klein y Quattrone para el caso particular de alimentos de consumo humano y veterinario solubles en hidrocarburos se resume en una extracción de la muestra disuelta en isooctano con tres porciones de ácido clorhídrico, de la fracción acuosa resultante se lleva a cabo el análisis por espectrofotometría de UV-visible. Se utilizó como blanco para el ajuste del equipo a cero de absorbancia disolución de ácido clorhídrico 1 M; y se





Realizaron las mediciones a longitudes de onda de 296 y 220 nm que es la que se propone en la literatura y donde se encontró otro máximo de absorción para el estándar de etoxiquin respectivamente; se realizó un barrido del espectro desde 180 hasta 600 nm que es el intervalo que permite el equipo con el cual se trabajó. Para el análisis por CGC y CGC-EM de la fracción acuosa fue necesario un tratamiento posterior con disolución de hidróxido de potasio y una extracción con diclorometano. El estudio se realizó tanto con el estándar de etoxiquin, como con la muestra en estudio; los resultados en ambos casos se compararon para verificar la efectividad de la separación de etoxiquin.

Al disolver la muestra en isooctano se observó, en el fondo del matraz, un producto insoluble de color naranja-café característico de la muestra, el análisis se continuó con la disolución resultante. El espectro de absorción electrónica que se obtiene de la extracción con ácido clorhídrico se muestra en la figura 4.2.6.

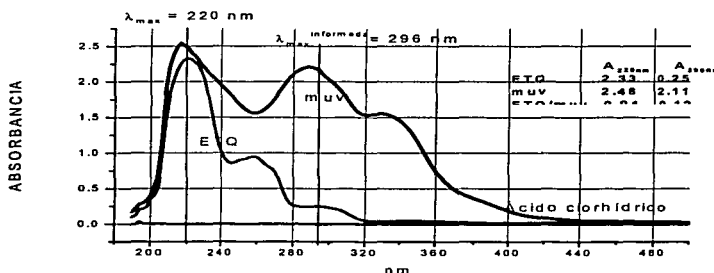


Figura 4.2.6 Análisis por espectrofotometría de UV-visible de la disolución acuosa ácida resultante de la extracción

Los resultados obtenidos, nos llevan a inferir que las longitudes de onda seleccionadas para el estudio, no son adecuadas, dado que ya como se demostró anteriormente, en la muestra no hay presencia de etoxiquin, si no de etoxiquinolina. Los máximos de absorción de éstos dos compuestos presentan diferencias debido a las características de cada molécula (Ver Anexo 3), por lo que al no coincidir los máximos de absorción, la determinación cuantitativa a éstas longitudes de onda no es la adecuada. Sin embargo, hay datos publicados en la literatura que nos ayudan a conocer (muy confiablemente) que las diferencias entre los máximos de absorción entre el etoxiquin y la etoxiquinolina, son

TESIS CON  
FALTA DE ORIGEN

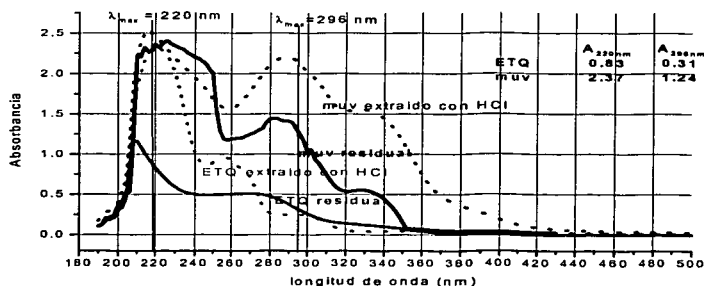






de aproximadamente 20 a 30 nm en el mismo medio; si también tomamos en consideración que la intensidad que se obtiene a las longitudes de onda estudiadas no difiere mucho en la mayoría de los casos con la obtenida a las longitudes de onda modificadas, se pueden realizar determinaciones cuantitativas un tanto superficiales; por lo que los siguientes resultados se analizaron tomando en cuenta dichas consideraciones.

Después de su análisis, la fracción acuosa ácida se trató con disolución de hidróxido de potasio hasta un pH aproximadamente de 12 y se realizó la extracción con 1 mL de diclorometano; la fracción acuosa residual, nuevamente se analizó por espectrofotometría de UV-visible para verificar la ausencia de absorbanza característica de etoquin en ambas muestras, el espectro de absorción electrónica se muestran en la figura 4.2.7.



TESIS CON  
 FOLIA DE ORIGEN

Figura 4.2.7 Análisis por espectrofotometría de UV-visible de los residuos de la extracción con diclorometano del estándar de etoquin y de la muestra

	$\lambda = 220 \text{ nm}$		$\lambda = 296 \text{ nm}$	
	Abs <sub>D,Ext.</sub> / Abs <sub>A,Ext.</sub>	% extracción	Abs <sub>D,Ext.</sub> / Abs <sub>A,Ext.</sub>	% extracción
<b>ETQ</b>	0.36	64	1.24	>100
<b>muv</b>	0.96	4	0.59	41

Tabla 4.2.1 Porcentaje de extracción con diclorometano

En el espectro de absorción, se puede observar que aún después de la extracción con diclorometano, hay absorción característica de etoquin y en la muestra, casi no se observaron diferencias en la absorción después de dicha extracción. Lo anterior nos hace





suponer que hay presencia de interferencias debidas a otros componentes de la muestra que presentan absorción en longitudes de onda muy similares que el etoquin y que la etoquinolina. Con respecto a la recuperación de la extracción se observó que tiene dependencia con la longitud de onda seleccionada, ya que como se puede observar en la tabla 4.2.1 en la longitud de onda de 296 nm hay una recuperación mayor. Sin embargo, no se puede decir a ciencia cierta el recobro real de la extracción con diclorometano debido a la inadecuada selección de la longitud de onda, complejidad e interferencias de la muestra y comportamiento diferente que presenta el etoquin y la etoquinolina en los diferentes medios utilizados; ya que todo esto nos lleva a resultados poco confiables con respecto a su cuantificación.

Debido a esto se tuvo que realizar los análisis por CGC de la fracción de diclorometano resultante para la comparación de las técnicas evaluadas y la comparación dos formas de detección; los cromatogramas resultantes se muestran en las figuras 4.2.8 y 4.2.9 (Nota: los cromatogramas están a diferentes valores de ampliación o atenuación para su mejor comparación).

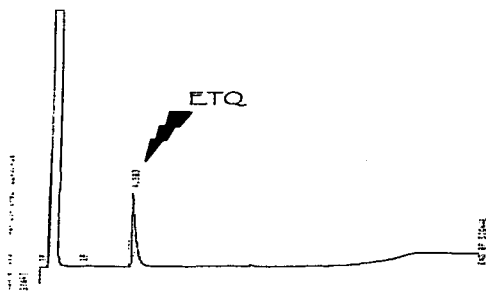


Figura 4.2.8 Cromatograma del extracto de estándar de etoquin resultante

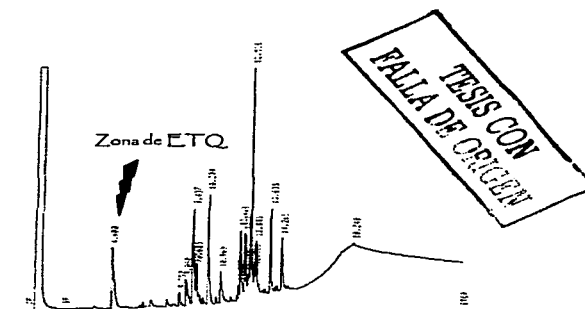
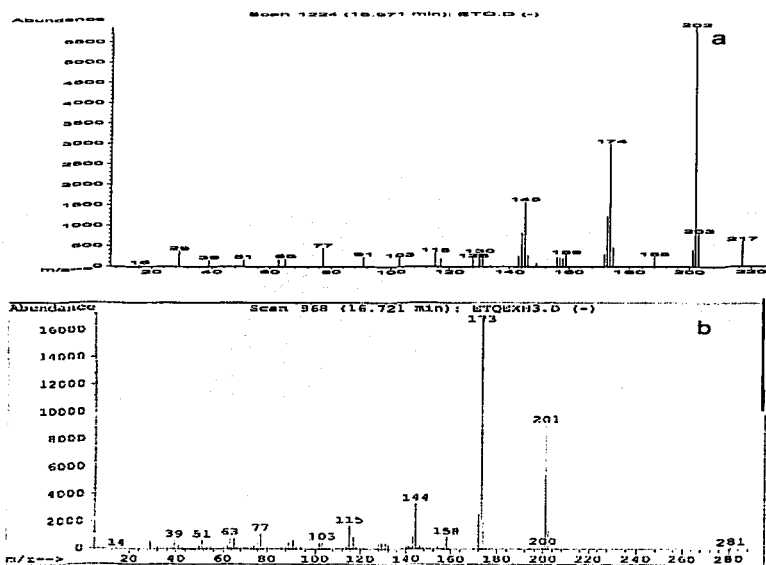


Figura 4.2.9 Cromatograma del extracto de la muestra resultante

Con respecto al análisis por CGC se encontró que en el caso de la muestra, se obtuvo un cromatograma con un menor número de señales y además libre de interferencias en la zona donde aparece la señal característica de etoquin, lo que hace una separación más eficiente en comparación de las anteriores.



Sin embargo, la señal que se supone es de etoxiquin en la muestra, no presenta el mismo tiempo de retención que en el estándar, por lo que se supone que sea la señal debida a la etoxiquinolina nuevamente. Se continúa con su identificación por CG-EM para asegurar la identidad de dicha señal; los espectros de masas obtenidos se muestran en la figura 4.2.10 a y b.



TESIS CON  
 FALTA DE ORIGEN

Figura 4.2.10 Espectros de masas obtenidos del análisis de (a) estándar de etoxiquin y (b) extracto de muestra

Con respecto al análisis por CGC-EM de la fracción resultante, se encontró que al analizar las muestras por CG-EM se demostró la identidad del etoxiquin por las señales características de 174, 202, 217 m/z y en la muestra se observa nuevamente la presencia de la etoxiquinolina con señales características de 144, 173, 201 m/z (Ver Anexo 2); éstos resultados nos hacen concluir que en la muestra no hay presente etoxiquin.





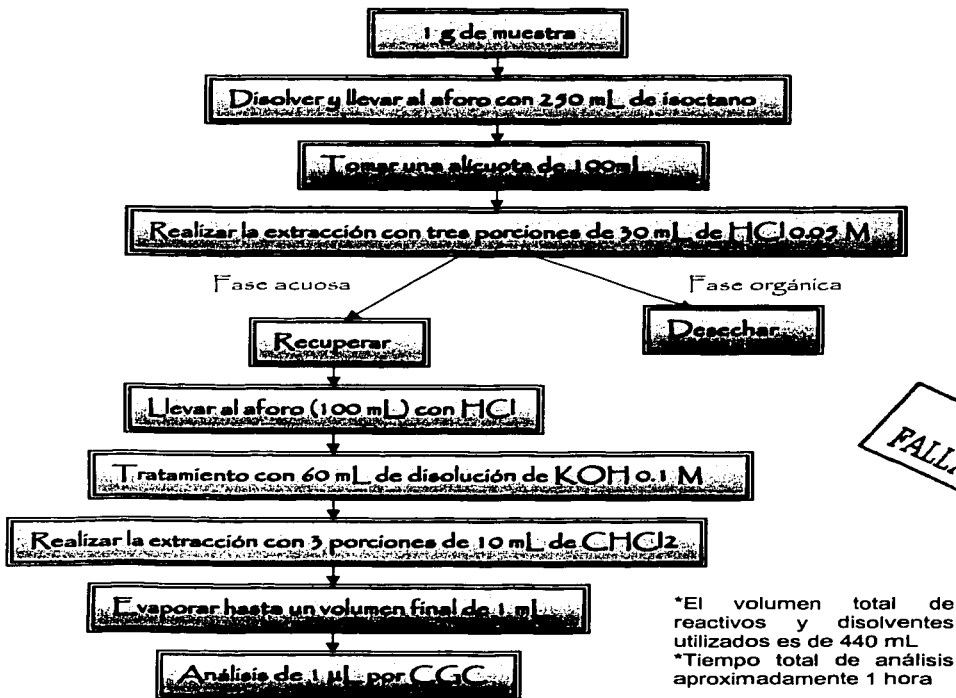
Debido a que no hay etoxiquin en las muestras en estudio, pero si la hay presencia de etoxiquinolina que es un producto de degradación del mismo etoxiquin y que además este presenta la misma actividad como antioxidante,<sup>12,13</sup> las determinaciones cuantitativas se realizaron con base en su producto de degradación.

En resumen, los resultados de los estudios, permiten concluir que: a) la extracción líquido-líquido con ácido clorhídrico favorece una separación selectiva y eficiente del etoxiquin en la muestra, b) la detección por UV-visible no es adecuada debido a que hay interferencias debido a componentes de la muestra que presentan absorción en el mismo intervalo de longitudes de onda que los máximos de absorción del etoxiquin, c) la identificación por CGC-EM indica que en la muestra no hay presente etoxiquin, si no la 2,4-dimetil-etoxiquinolina (etoxiquinolina) que es un producto de degradación del etoxiquin que presenta la misma actividad antioxidante,<sup>12,13</sup> por lo que de aquí en adelante nos referimos tanto al etoxiquin como a la etoxiquinolina, d) se observó que no se requiere una hidrólisis básica previa para obtener una separación eficiente y selectiva, e) los cromatogramas obtenidos con esta última técnica de extracción están libres de interferencias en la zona donde sale la señal característica de etoxiquin, por lo que es un análisis más selectivo en comparación con el anterior, f) el costo del análisis sigue siendo alto debido al alto consumo de disolventes.

### Propuesta de una metodología de extracción

Debido a que este último procedimiento estudiado resultó ser el que mejores resultados arroja tanto en eficiencia como en selectividad, se propone el procedimiento analítico que se muestra en el diagrama de la figura 4.2.11 para la extracción de etoxiquin de la muestra en estudio y su determinación cuantitativa por CGC.





TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Figura 4.2.11 Propuesta de metodología analítica para la extracción de etoquin de una muestra y su determinación cuantitativa por CGC

Con el propósito de evitar el alto consumo de disolventes y aumentar el porcentaje de recobro, se optimizaron los parámetros críticos en la metodología de extracción líquido-líquido. Cabe mencionar que en la literatura se informa de porcentajes de recobro del 99 por ciento, en el caso del análisis por espectrofotometría de UV-visible, que no se obtuvieron por CGC.





En la siguiente sección se presentan los resultados de los estudios realizados para la optimización del tipo de disolventes, volumen y acidez del medio para la metodología de extracción líquido-líquido de etoxiquin de una muestra para su posterior análisis cuantitativo por CGC.

## OPTIMIZACIÓN DE METODOLOGÍA ANALÍTICA

### 4.2.2 Optimización de la técnica de extracción por disolventes de etoxiquin a partir de una muestra

Para la optimización de la metodología analítica propuesta para la extracción líquido-líquido de etoxiquin en una muestra para su posterior determinación cuantitativa por CGC, es necesario optimar cada uno de los procesos que se llevan a cabo durante la metodología, para así obtener al final una metodología sencilla, eficiente, selectiva y que nos proporcione el mayor rendimiento posible; en este caso se debe optimar principalmente el consumo de disolventes, la mejor disolución de la muestra, la acidez del medio y la naturaleza de los disolventes, sobre todo del disolvente para la extracción final, ya que de éste depende en gran parte el recobro de etoxiquin; todos los estudios se realizaron únicamente con el estándar de etoxiquin, a excepción del estudio del disolvente para la disolución de la muestra. En las siguientes secciones se presentan los resultados de los estudios realizados.

#### 4.2.2.1 Modificación al proceso de extracción por disolventes propuesto

El primer estudio que se realizó fue la reducción de los volúmenes de los disolventes que se utilizan para el proceso de extracción líquido-líquido del etoxiquin debido a que el consumo de disolventes establecido en la metodología propuesta era excesivo.

La metodología se modificó reduciendo proporcionalmente las cantidades inicialmente propuestas, se utilizaron 10 mL de etanol para la disolución del estándar de etoxiquin y las extracciones en todos los casos se realizaron con 5 mL de los disolventes; en los





resultados se observó que no existe diferencia en cuanto a la eficiencia de la extracción, la ventaja de esta modificación es que el consumo de disolventes disminuyó de aproximadamente 440 mL hasta un volumen de aproximadamente 50 mL, lo que reduce el costo del análisis, y facilita la manipulación de las muestras.

#### 4.2.2.2 Efecto de la concentración de ácido clorhídrico sobre la extracción

El estudio del efecto de la concentración de ácido clorhídrico sobre la extracción se realizó para determinar la concentración y el número de extracciones adecuadas para obtener los mejores rendimientos de la extracción. Se colocaron 500  $\mu$ L de estándar de etoxiquin en isoctano y se realizaron extracciones sucesivas de 1 mL de ácido clorhídrico hasta no observar señal por CGC de etoxiquin en el isoctano residual se utilizaron diferentes concentraciones de ácido clorhídrico: 1, 0.1, 0.01, y 0.001 M.

Para determinar cuantitativamente el etoxiquin residual, se tomó en cuenta como 100 % el área que se obtiene del análisis por CGC de la misma cantidad de estándar de etoxiquin que es sometido al proceso de extracción, este valor se relacionó con el que se obtiene de la inyección del isoctano residual de cada una de las extracciones; los resultados de este estudio se muestran en la figura 4.2.12

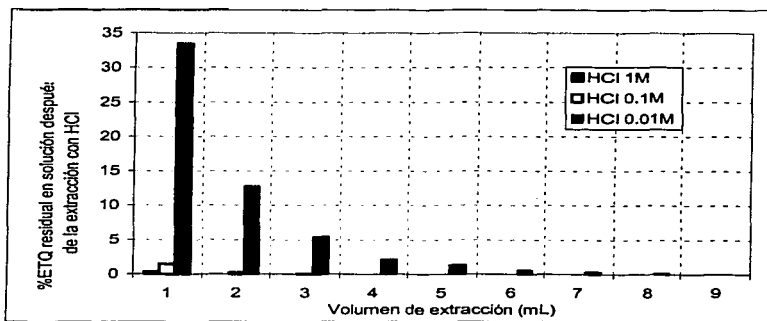


Figura 4.2.12 Extracción de estándar de etoxiquin con ácido clorhídrico a partir de disolución en isoctano variando la concentración del ácido

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Con respecto al número de extracciones que se deben realizar para obtener el mínimo porcentaje de etoxiquin presente en el isoctano residual, se encontró que depende de la concentración de ácido clorhídrico, en el caso del ácido clorhídrico de concentración 1 M la extracción total de etoxiquin en disolución se logró con una sola extracción de 1 mL de ácido, el porcentaje residual en este caso es aproximadamente del 0.2%, en los otros casos se requieren más extracciones para obtener resultados similares. Se consideraron concentraciones más diluidas a 1 M debido a que el pKa calculado del etoxiquin es de 5.4 por lo que se esperaba que dos unidades por debajo de este valor (pH aproximadamente de 3) se encontraría la totalidad de etoxiquin en su forma protonada por lo cual se puede extraer en la fase acuosa, sin embargo esto no ocurrió; las diferencias observadas indican que los equilibrios ácido – base asociadas a la extracción propuesta son más complejos de lo que se suponía.

Los resultados con ácido clorhídrico de concentración 0.001 M, que no se muestran en la figura 4.2.12, mostraron que se necesitan aún más de las 9 extracciones que se requieren con la concentración 0.01 M. De acuerdo a los resultados obtenidos se decidió utilizar ácido en concentración 1 M para que con una porción de 2 mL se recupere totalmente el etoxiquin en disolución, en lugar de la extracción con tres porciones de 5 mL de la metodología propuesta anteriormente.

Después de la extracción con ácido clorhídrico del etoxiquin presente en la disolución en isoctano, se requiere un tratamiento con hidróxido de potasio del medio ácido para la neutralización y lograr la extracción de etoxiquin con isoctano, el siguiente estudio comprende el efecto del pH del medio acuoso sobre el rendimiento de la extracción y los resultados obtenidos se presentan a continuación.

#### **4.2.2.3 Efecto del pH en la extracción**

Este estudio se realizó para verificar que el pH del medio en la extracción final no modifica el rendimiento de la recuperación del etoxiquin en la fracción acuosa. Se colocaron 500  $\mu$ L de estándar de etoxiquin en isoctano, se realizó la extracción con una porción de 2 mL de ácido clorhídrico de concentración 1 M y se ajustó a pH aproximadamente de 7, 10, 12 y 14 con disolución de hidróxido de potasio, a cada una de las soluciones resultantes se les







realizó la extracción con dos porciones de 5 mL de isooctano; las fracciones resultantes se juntaron y se les adicionó estándar interno, se evaporaron hasta un volumen final de 5 mL y de éstas soluciones se realizó el análisis por CGC estudiando únicamente la señal característica de etoxiquin.

Para determinar cuantitativamente las diferencias del etoxiquin que se extrae en función del pH del medio, se tomó en cuenta como 100 % la relación de áreas que se obtiene del análisis por CGC de la misma cantidad de etoxiquin y el estándar interno, los resultados se muestran en la figura 4.2.13

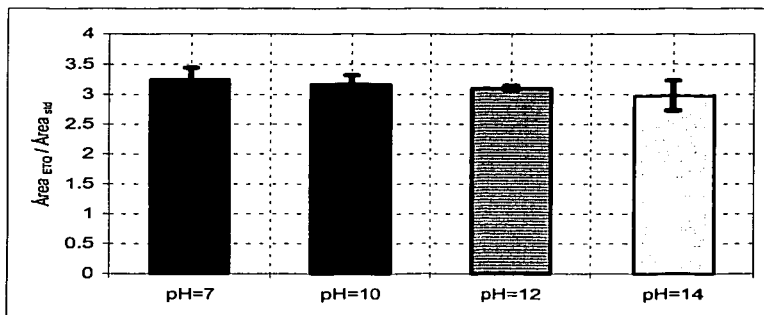


Figura 4.2.13 Extracción de estándar de etoxiquin a partir de disolución acuosa a diferentes valores de pH

Se observa que con los diferentes valores de pH no existen diferencias significativas en cuanto a la recuperación de etoxiquin, lo que nos indica que el valor de pH que posea la fase acuosa no modifica la extracción, siempre y cuando sea un pH superior a 7. Se decidió que el pH que se debe tener para realizar la extracción final de etoxiquin fuera de 10 aproximadamente.

Para establecer el pH 7 y 14 se tuvieron dificultades. Se observó que conforme aumentaba el volumen de adición de disolución acuosa de hidróxido de potasio para establecer el pH del medio, el rendimiento de la extracción disminuía, lo que nos lleva a

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN





suponer que el rendimiento de la extracción se puede ver modificado por el volumen de la fracción acuosa. Debido a esto se propone ajustar el pH del medio entre 8 y 10 con 200 mg de bicarbonato de sodio sólido, para así evitar bajos rendimientos.

#### 4.2.2.4 Efecto del disolvente sobre la extracción

El estudio del efecto del disolvente utilizado para la extracción final del etoxiquin presente en la disolución acuosa, se realizó para seleccionar el disolvente con el que se obtienen mejores rendimientos de la extracción, con un menor volumen y señales cromatográficas adecuadas. Para el estudio se colocaron 500  $\mu$ L de estándar de etoxiquin en isooctano, se realizó la extracción con una porción de 2 mL de ácido clorhídrico de concentración 1 M, se ajustó a un pH aproximadamente de 10 con bicarbonato de sodio y a la disolución obtenida se le realizaron extracciones sucesivas con porciones de 1 mL de disolventes hasta no obtener señal característica de etoxiquin por CGC; los disolventes evaluados fueron isooctano, tolueno, diclorometano, hexano y disolución de trietilamina (TEA). Para determinar cuantitativamente las diferencias de la extracción de etoxiquin con cada uno de los disolventes utilizados, se tomó en cuenta únicamente la señal debida a etoxiquin para verificar que en todos los casos la cantidad extraída es similar y la diferencia es solamente en el número de extracciones realizadas; los resultados de este estudio se muestran en la tabla 4.2.2 y en la figura 4.2.13

Volumen de disolvente	Área ETQ (isooctano)	Área ETQ ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ )	Área ETQ (Hexano)	Área ETQ (TEA)
1 mL	372622	20892	358862	52326
2 mL	24689	19874	28742	0
3 mL	12642	13907	16587	0
5 mL	4317	865	2889	0
10 mL	2716	485	1954	0
15 mL	589	0	546	0
20 mL	242	0	175	0
25 mL	150	0	130	0
Área total	417967	54023	409885	52326

Tabla 4.2.2. Comparación de áreas obtenidas con diferentes disolventes



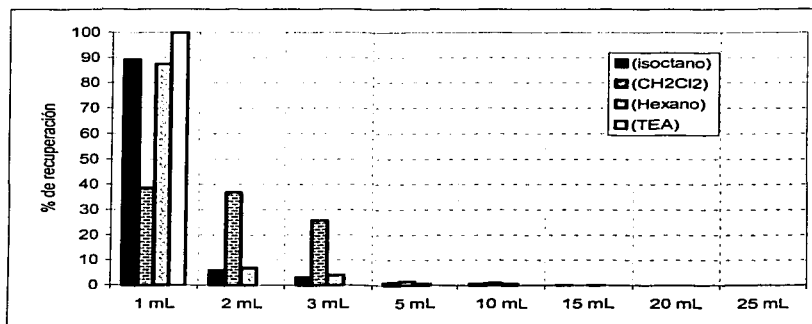


Figura 4.3.13 Porcentaje de recuperación de etoxiquin con distintos disolventes

TESIS CON  
 FALTA DE ORIGEN

Con respecto al volumen de los disolventes que se debe utilizar para la extracción cuantitativa del etoxiquin presente en una disolución acuosa de pH aproximadamente de 10, se encontró que con isooctano y hexano se requerían más de 25 mL, esto implica un gasto excesivo en el consumo de disolventes y una dilución grande, por lo que hay necesidad de disminuir el volumen final para una mejor detección en el análisis por CGC con lo que el tiempo de análisis aumenta considerablemente. En el caso del diclorometano se encontró que son necesarios 10 mL de disolvente para que no se observen señales de importancia por CGC debidas al etoxiquin, en este caso el volumen gastado es mucho menor en comparación con el volumen de isooctano y hexano, además cabe mencionar que el diclorometano es un disolvente muy fácil de evaporar debido a su bajo punto de ebullición (39 °C). Al realizar el estudio con disolución de trietilamina se encontró que es suficiente la extracción con una porción de 1 mL para obtener los mismos resultados que con los 10 mL de diclorometano, y los picos cromatográficos obtenidos son de buena calidad para el análisis cuantitativo. Los resultados de la extracción con tolueno no se muestran en la tabla 4.3.1 debido a que se requieren de hasta 10 extracciones con 5 mL para poder obtener casi la mitad de la recuperación esperada.

De acuerdo a los resultados obtenidos se estableció que las mejores condiciones para realizar la extracción son con una porción de 1 mL de disolución de trietilamina.





## Propuesta de la metodología analítica optimizada para la extracción de etoxiquin

Los estudios realizados nos proporcionan bases para proponer el procedimiento de una metodología analítica para la separación y extracción de etoxiquin de una muestra; el diagrama se presenta en la figura 4.3.14

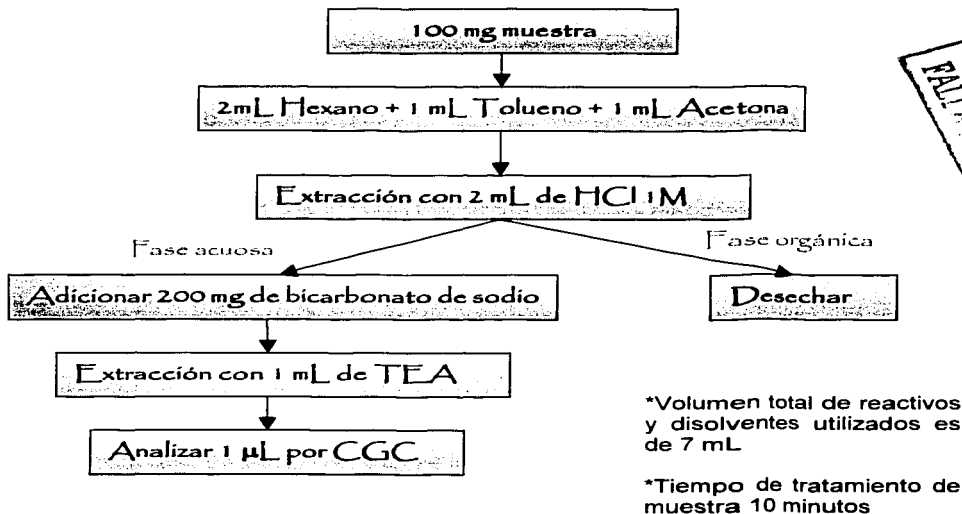


Figura 4.2.14 Propuesta de una metodología optimizada para la extracción de etoxiquin de una muestra y su determinación cuantitativa por CGC

Comparando esta metodología con sus parámetros críticos ya optimizados con la que se propone en la figura 4.2.11, se encontró que tanto el consumo de disolventes, manejo de muestra y tiempo del análisis se mejoró en consideración, lo que hace que la metodología resulte atractiva debido a su bajo costo por análisis. Sin embargo, para que una metodología sea confiable, es necesario que se determinen sus parámetros de calidad que evalúen la confiabilidad de las determinaciones; en la siguiente sección se presentan los resultados de los estudios realizados.





## PARÁMETROS DE CALIDAD

### 4.2.3 Determinación de los parámetros de calidad

Para que una metodología analítica sea confiable, se deben determinar sus parámetros de calidad que no son más que criterios expresados en números que evalúan la técnica. Algunos de los parámetros son: **precisión**, que esta relacionada con la dispersión de los resultados, para que un método sea confiable debe presentar baja dispersión; la *repetibilidad* es una de las formas en que se evalúa la precisión de una metodología, una vez que se tienen establecidas las condiciones de trabajo, se realizan  $n$  mediciones y se determina su dispersión. **Exactitud**, que esta relacionada con el error y se mide como la diferencia entre un valor cierto y uno medido, para que un método se confiable, éstas diferencias deben ser pequeñas; un análisis por *adiciones patrón* es una forma de evaluar la exactitud de una metodología, se estudian muestras enriquecidas con un estándar del compuesto de interés y se demuestra que la cantidad adicionada y la medida son iguales en todo el intervalo de trabajo. **Linealidad del método**, demuestra si la respuesta del proceso de medición es lineal en el intervalo de concentraciones requerido, una *curva de calibración* en el intervalo de concentraciones de interés es un forma de evaluar la linealidad del método; cuando se relaciona la linealidad del método y la exactitud podemos determinar un parámetro de suma importancia en las metodologías analíticas que involucran determinaciones cuantitativas, el *porcentaje de recuperación*. **Límite de detección**, es la cantidad de analito por encima de la cual la medición es confiable, es decir por encima del límite de detección estamos seguros de la presencia del analito con un 95 % de confianza; por lo tanto este es un valor teórico que se obtiene a partir de datos experimentales. A continuación se presentan los resultados de la determinación de linealidad, repetibilidad, porcentaje de recuperación, exactitud y límite de detección de la metodología analítica optimizada propuesta. Cabe recordar aquí, que en los anteriores estudios se demostró la presencia de etoxiquinolina y no de etoxiquin en las muestras analizadas. Debido a que solamente contamos con el estándar de etoxiquin, suponemos que la respuesta de ambos (etoxiquin y etoxiquinolina) va a ser similar en el detector FID del cromatógrafo de gases.





### 4.2.3.1 Determinación de la linealidad

#### 4.2.3.1.1 De la determinación cuantitativa por CGC

La determinación de la linealidad se realizó por medio de una curva de calibración, utilizando un intervalo de concentraciones de estándar de etoxiquin aproximadas a la presente en una de las muestras en estudio. Las soluciones utilizadas se prepararon conforme a lo descrito en la parte experimental del presente trabajo. Se elaboró una grafica tomando en cuenta la relación de áreas del etoxiquin y del estándar interno que se obtienen del análisis por CGC ( $A_{ETQ}/A_{Std}$ ) en función de la concentración de etoxiquin (ppm ETQ), los resultados se muestran en la figura 4.2.15

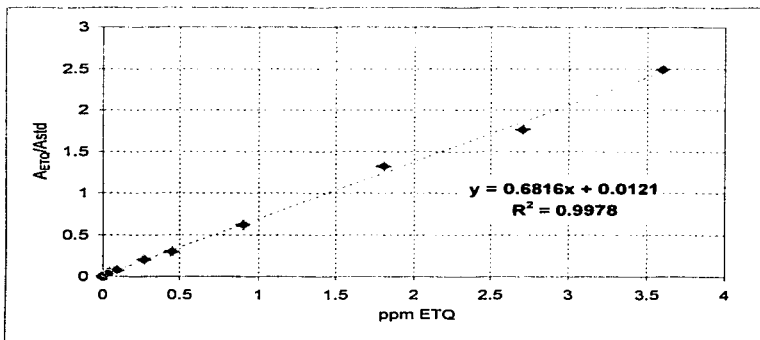


Figura 4.2.15 Curva de calibración para determinar la linealidad del análisis por CGC

Se puede observar en la grafica trazada que los datos a simple vista presentan un comportamiento lineal. A partir del análisis de datos que se presentan en el Anexo 1, se puede concluir que acuerdo al coeficiente de correlación 0.9978 y el riesgo de que no sea una recta  $2.26 \times 10^{-11} \%$ , afirman que la relación que guardan los resultados presentados es lineal. Se realizó una prueba de hipótesis sobre la ordenada al origen (Ver Anexo 1) para verificar si se puede considerar como cero y se encontró que se acepta la hipótesis nula ( $H_0: b=0$ ), de acuerdo con esto, la pendiente de la función de ajuste corresponde al factor de respuesta  $F_r$ , por lo que si trabajamos en las mismas condiciones, podemos





determinar la concentración de etoxiquin presente en muestras tomando en cuenta la relación:

$$\text{Respuesta} = Fr * \text{Concentración}$$

#### 4.2.3.1.2 De la metodología analítica propuesta

La determinación de la linealidad de la metodología, se realizó por medio de una curva de adiciones estándar aplicando el método en muestras reales, utilizando un intervalo de concentraciones de estándar de etoxiquin aproximadas a la presente en una de las muestras en estudio. Las soluciones utilizadas se prepararon conforme a los descrito en la parte experimental del presente trabajo. Se elaboró una grafica tomando en cuenta la relación de áreas del etoxiquin y del estándar interno que se obtienen del análisis por CGC ( $A_{\text{ETQ}}/A_{\text{std}}$ ) en función de la concentración de etoxiquin adicionado (ppm ETQ), los resultados se muestran en la figura 4.2.16

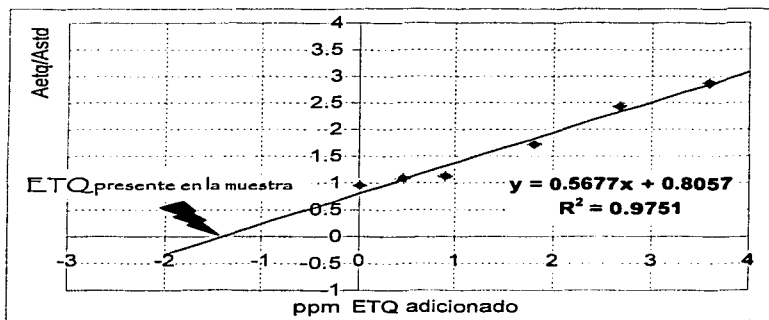


Figura 4.2.16 Curva de adiciones patrón para la determinación de la linealidad de la metodología analítica propuesta





Se puede observar en la grafica trazada que los resultados presentan un comportamiento lineal más bajo -en comparación con la curva de calibración- pero suficientemente bueno para considerarlo como un ajuste lineal, debido a que no hay fundamentos ni evidencia que nos refuten el comportamiento lineal de nuestros resultados, proponemos que la dispersión que se observa en estos, es debida a errores aleatorios propios del trabajo experimental. A partir del análisis de datos que se presentan en el Anexo 1, se puede concluir que acuerdo al coeficiente de correlación 0.975 y el riesgo de que no sea una recta  $2.26 \times 10^{-11} \%$ , afirman que la relación que guardan los resultados presentados es lineal. Se realizó una prueba de hipótesis sobre la ordenada al origen (Ver Anexo 1) para verificar si esta se puede considerar como diferente de cero y se encontró que se rechaza la hipótesis nula ( $H_0: b=0$ ), de acuerdo con esto, podemos determinar la concentración de etoxiquin presente en la muestra tratada, con la intersección de la recta de ajuste y el eje de concentraciones a las mismas condiciones de trabajo.

#### 4.2.3.2 Determinación del límite de detección

El límite de detección se determinó por la interpolación del resultado de la señal del blanco y tres veces su desviación estándar en la curva de calibración, tomando únicamente en cuenta los valores de concentración más pequeños para así obtener un valor de concentración; el segmento de la curva de calibración utilizado se muestra en la figura 4.2.17

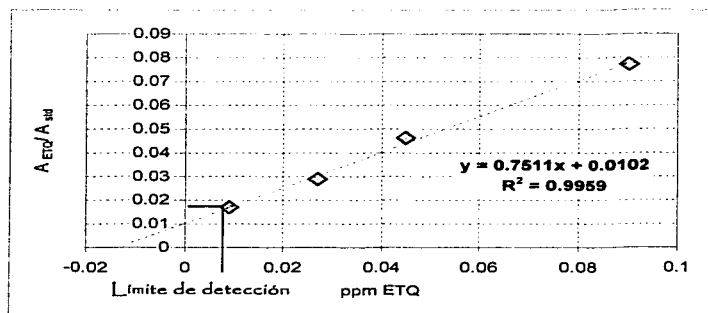


Figura 4.2.17 Curva de calibración para determinar el límite de detección







De acuerdo con la grafica, al extrapolar el valor obtenido se obtuvo que el límite de detección para las determinaciones por CGC es de 8 ppb de etoxiquin. Sin embargo hay que recordar que el límite de detección es un valor teórico, valor que si decimos que hay podemos cometer el error de que realmente haya o no haya etoxiquin en una muestra; esto es, por que experimentalmente se encontró que la cantidad mínima de etoxiquin que se puede observar por CGC es de 0.9 ppb, la figura 4.2.18 muestra el cromatograma que se obtiene con esta concentración.

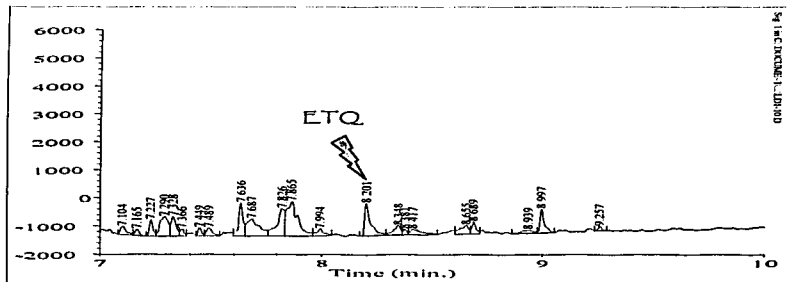


Figura 4.2.18 Cromatograma de etoxiquin a una concentración de 0.9 ppb

#### 4.2.3.3 Determinación de la reproducibilidad de la metodología analítica propuesta

La determinación de la reproducibilidad de la metodología analítica propuesta, se realizó mediante un análisis de residuos, para ello se realizaron seis series provenientes de una misma muestra con etoxiquin presente de concentración ya conocida. Las soluciones utilizadas se prepararon conforme a lo descrito en la parte experimental del presente trabajo y los resultados obtenidos se muestran en la figura 4.2.19



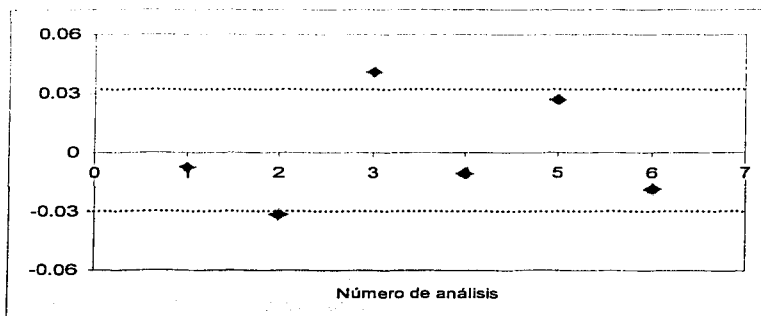


Figura 4.2.19 Determinación de la reproducibilidad del análisis por residuos

Análisis	Relación de áreas	Residuos
1	1.00463629	-0.00720407
2	0.98027243	-0.03156794
3	1.05289504	0.04105468
4	1.00128555	-0.01055481
5	1.03859362	0.02675326
6	0.99335925	-0.01848112
<b>Promedio</b>	1.01184036	
<b>Desviación estándar</b>	0.02793783	
<b>Intervalo de confianza</b>	0.02556439	

Tabla 4.2.3 Resultados estadísticos para la determinación de la reproducibilidad de la metodología analítica propuesta

Se determinó un coeficiente de variación del 2.8 % para el análisis de las muestras tratadas conforme a la metodología establecida en el presente trabajo, con respecto a la gráfica que se obtiene del análisis de residuos se puede observar que sólo uno de las muestras sale del límite de una desviación estándar, sin embargo debido al tipo de análisis que se está realizando, no es de gran relevancia el error cometido por lo cual no se descarta y se determina que la metodología es reproducible.





#### 4.2.3.4 Determinación del porcentaje de recobro de la metodología propuesta

Resulta de vital importancia para la confiabilidad de esta metodología, que se determine el porcentaje de recobro, para ello se relacionaron los resultados que se obtienen de la curva de calibración y la grafica de adiciones patrón en el mismo intervalo de concentraciones, de la gráfica se encuentra que el valor de la pendiente es el recobro de la metodología analítica, es decir el etoxiquin que se recupera al final del tratamiento. La grafica obtenida se muestra en la figura 4.2.20

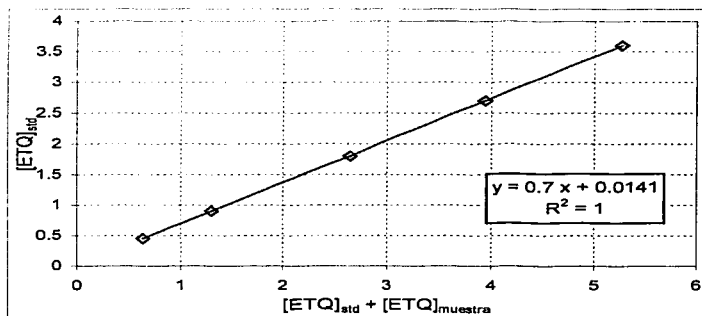


Figura 4.2.20 Grafica para obtener el porcentaje de recobro de la metodología analítica propuesta

De acuerdo con la grafica trazada, podemos determinar que el porcentaje de recobro de etoxiquin cuando se somete al tratamiento conforme a la metodología analítica propuesta, es de 70 %; lo anterior, tomando en cuenta la complejidad de la muestra indica que se puede estimar confiablemente la concentración de etoxiquin presente y para informar el resultado se debe tomar en cuenta este porcentaje obtenido.

Ya establecidos los parámetros de calidad que evalúan la confiabilidad de la metodología analítica propuesta, se continúa con el análisis de tres lotes de la muestra en estudio. En la siguiente sección se presentan los resultados.





## ANÁLISIS DE MUESTRAS

### 4.2.4 Análisis de tres lotes de una muestra

A continuación se presentan los resultados del análisis cuantitativo por CGC por triplicado de tres lotes proporcionados con diferente concentración de etoxiquin (según información proporcionada) previa extracción según la metodología propuesta en el presente trabajo. Cabe recordar que en anteriores estudios, se encontró la presencia de etoxiquinolina en la muestra y no de etoxiquin; considerando que se está utilizando un detector FID para el análisis por CGC y que, por lo tanto, la respuesta es igual para ambos compuestos, se llevarán a cabo las determinaciones cuantitativas de la etoxiquinolina con la curva de calibración de etoxiquin. Se nos proporcionaron 100 g de tres lotes de una muestra, de las cuales se tomaron para el análisis 100 mg de cada bolsa (cabe mencionar que en todos los casos antes de tomar la muestra de la bolsa, se llevó a cabo una agitación vigorosa del producto para que el muestreo fuera representativo). Se llevó a cabo el tratamiento de las muestras conforme a la metodología de extracción propuesta, su determinación cuantitativa fue por CGC y la identificación de etoxiquinolina fue por CGC-EM; los resultados del análisis cuantitativo obtenidos se muestran a continuación en la tabla 4.2.4, los cromatogramas de los análisis y su identificación por EM se muestran en las figuras 4.2.21 y 4.2.22.

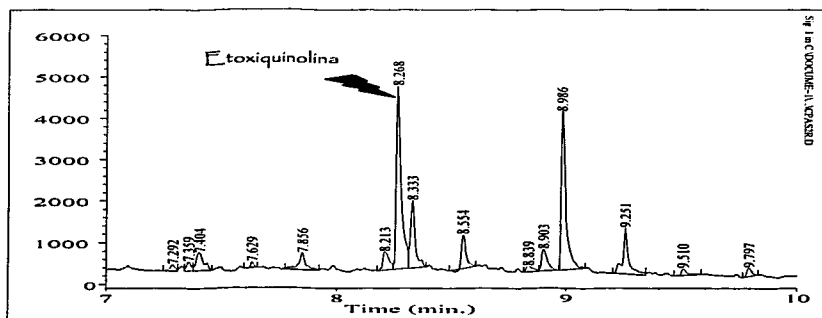


Figura 4.2.21 Cromatograma típico del análisis del extracto de una muestra de uso veterinario. (Lote CPT-43)





Para verificar la identidad de la señal característica, se continuó con su identificación de por CGC-EM, los resultados obtenidos se muestran en la figura 4.2.22

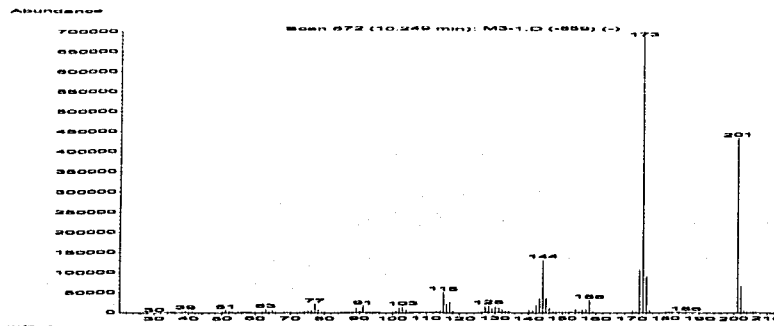


Figura 4.2.22 Espectro de masas de la identificación de etoxiquinolína

Ya identificados el producto del etoxiquin presente en la muestra, se llevó a cabo la determinación cuantitativa por medio de una curva de calibración, encontrándose los resultados que se presentan en la tabla 4.2.4

	Lote CPT-43	Lote L-97914	Lote L-89375
<b>Muestra 1</b>	24	15	346
<b>Muestra 2</b>	24	13	316
<b>Muestra 3</b>	20	13	355
<b>Cantidad promedio de etoxiquin en muev</b>	23 ppm	14 ppm	339 ppm
<b>Desviación estándar</b>	0.10	0.03	0.97
<b>% C.V.</b>	9.50	4.98	6.02
<b>Cantidad de etoxiquin determinada por otra técnica</b>	<b>393</b>	<b>11</b>	<b>1562</b>

Tabla 4.2.4 Determinación cuantitativa por CGC del etoxiquin presente en tres lotes de muestra

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Ya establecida y evaluada la metodología propuesta para separación y extracción por disolventes de etoxiquin en una muestra previa a su determinación por CGC, se continuó con su evaluación como modelo para la técnica de EFS con la que se pretende disminuir en gran cantidad la generación de residuos y preferentemente aumentar el factor de concentración de etoxiquin. Los cartuchos para EFS que se evaluaron presentan como principal limitante el uso de soluciones acuosas para eluir y el intervalo de pH al cual el material de empaque permanece estable, por lo tanto se realiza la evaluación utilizando como disolventes principales, hexano y metanol, ya que en la evaluación de la técnica informada en 1964, se encontró que con éstos disolventes ocurre una separación aunque muy poco cuantitativa. Los resultados de los estudios de la técnica de EFS se presentan en la siguiente sección.

#### 4.3 EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

Como ya se demostró anteriormente, la muestra en estudio es de alta complejidad debido a su composición; se ha encontrado una técnica de extracción por disolventes que es útil para su separación y extracción; sin embargo, ésta metodología presenta porcentajes de recobro del 70 %, hay producción de residuos debido a las extracciones que deben realizarse y no ocurre una concentración total de etoxiquin. Por ello, nos dimos a la tarea de buscar otra metodología como la EFS y verificar si nos arroja mejores resultados en comparación con la metodología anteriormente propuesta.

Para evaluar la EFS como técnica preparativa de separación del etoxiquin en una muestra, se estudiaron dos tipos de materiales de empaque de los cartuchos, uno de fase normal ( $-NH_2$ ) y otro de fase inversa ( $C_{18}$ ). Se realizaron los estudios con estándar de etoxiquin y con la muestra problema para verificar si es posible obtener una separación adecuada, se estudiaron parámetros críticos como el volumen y composición de disolventes para el lavado y elución de los componentes de la muestra. En las siguientes secciones se presentan los resultados de los estudios realizados.





Dada la naturaleza polar del etoxiquin se espera que este compuesto sea retenido en el cartucho de fase normal y que los compuestos no polares eluyan con el lavado del cartucho para así eliminar los componentes que no son de interés; la elución del etoxiquin y de otros compuestos polares puede realizarse con lavados con un disolvente de naturaleza polar como metanol, dada las limitantes del cartucho. En el caso de los cartuchos de fase inversa, el etoxiquin deberá eluir con un disolvente de naturaleza polar como el metanol. Con la EFS se espera lograr un fraccionamiento de los compuestos presentes en la muestra y de esta forma obtener una separación cuantitativa del etoxiquin libre de interferencias para el análisis y cuantificación eficiente por CGC. A continuación se presentan los resultados de los estudios realizados.

#### 4.3.1 Evaluación de fase amino, $\text{NH}_2$ (fase normal)

##### 4.3.1.1 Estimación de volúmenes de disolventes para el lavado y elución del cartucho

Se realizó esta primera prueba para la estimación de los volúmenes de disolventes necesarios para: a) el lavado del cartucho, así eliminar los componentes de la muestra que no quedan retenidos y que provocan interferencias en la determinación del etoxiquin por CGC y b) la elución de los componentes de la muestra retenidos en el cartucho de EFS. Con esto se podrá seleccionar una o varias fracciones donde se tenga separado al etoxiquin de los otros componentes de la muestra. Para la estimación de los volúmenes de disolventes, se realizó la adición de hexano en volúmenes de 1 mL en 1 mL al cartucho previamente cargado con la muestra, y se recolectaron los mismos en fracciones separadas hasta no obtener señales significativas, continuando con la adición de 1 mL en 1 mL de metanol hasta nuevamente no obtener señales por CGC; cada una de las fracciones se evaporaron hasta 0.2 mL y de éstas se inyectó 1  $\mu\text{L}$  al cromatógrafo de gases. La evolución cuantitativa del proceso se registró con base en el área total de cada cromatograma lo que nos permite conocer el volumen de disolvente que nos asegura la elución y el lavado de los compuestos; los resultados del estudio y un cromatograma típico de la primera fracción con hexano y metanol, se muestran en la figura 4.3.1 y 4.3.2 a y b



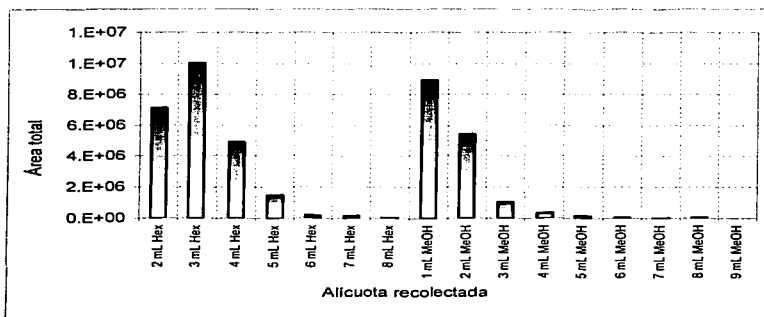


Figura 4.3.1 Estimación del volumen de disolvente Hexano y Metanol

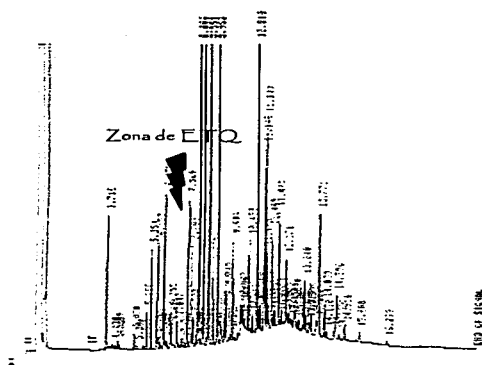


Figura 4.3.2 a Cromatograma típico de una fracción eluida con Hexano

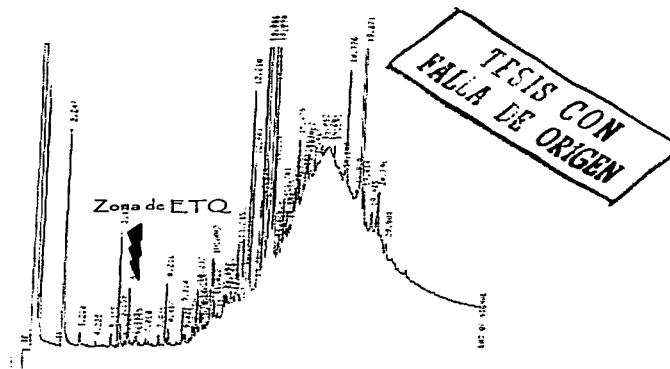


Figura 4.3.2 b Cromatograma típico de una fracción eluida con Metanol

De acuerdo con la figura 4.3.1, se observó que son suficientes 5 mL de hexano para el lavado del cartucho, ya que el área de este volumen es de mayor significado cuando se comparó con la que se obtiene aún realizando más adiciones de hexano. Después de ocho adiciones de hexano, se comenzaron las adiciones de metanol anhidro.







El área que se obtuvo después de la primera adición de metanol aumentó considerablemente, se encontró que son suficientes 5 mL de metanol para la elución los compuestos retenidos en el cartucho, ya que el área que se obtiene con este volumen es comparablemente mayor con la que se obtiene aún realizando más adiciones de metanol. De acuerdo con los resultados, se decide utilizar 6 mL de hexano y 6 mL de metanol para el lavado y elución del cartucho ya que adiciones mayores de estos disolventes no producen resultados más favorables. En los cromatogramas típicos de las fracciones con hexano y metanol, figura 4.3.2 a y b respectivamente, se observó que no se logró una zona libre de interferencias donde aparece la señal característica de etoxiquin, lo que ocasiona que el análisis sea poco confiable.

La complejidad de la muestra se comprobó nuevamente, ya que se observa en los cromatogramas un gran número de señales en ambas fracciones, lo que nos indica la presencia de un alto contenido de componentes poco polares, que eluyen con el hexano, y un alto contenido de componentes polares, que eluyen con metanol presentes en la muestra. Se sugiere que el comportamiento que presenta la muestra en estudio al ser sometida al proceso de EFS con las condiciones mencionadas, es debido precisamente a esta complejidad.

Con la propuesta anterior de los volúmenes de hexano y metanol a utilizar, se continúa con la determinación cuantitativa de etoxiquin en la muestra; los resultados del análisis cuantitativo se presentan a continuación.

#### 4.3.1.1.1 Análisis cuantitativo de etoxiquin en una muestra con volúmenes de disolventes estimados

Para la determinación cuantitativa se sometió a una EFS de la muestra con los volúmenes de disolventes estimados, se hicieron adiciones de 1 mL en 1 mL hasta un total de 6 mL de hexano y 6 mL de metanol, se colectaron fracciones de 1 mL y se evaporaron hasta 0.2 mL, de éstas disoluciones se inyectó 1  $\mu$ L al cromatógrafo de gases; las áreas obtenidas de cada inyección se relacionaron con el volumen de disolvente; los resultados se muestran en la figura 4.3.3.



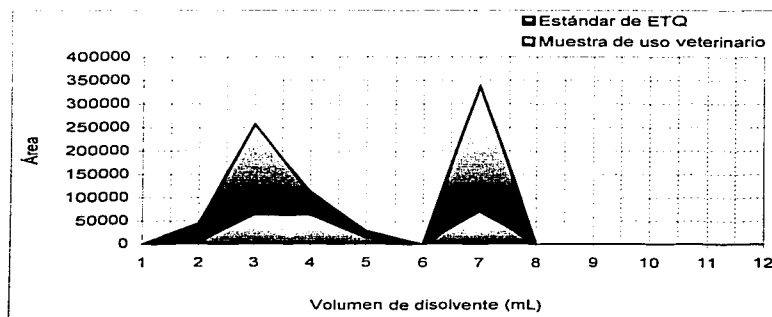


Figura 4.3.3 Perfil de área de señal característica de etoxiquin

Se encontró en ambos casos, que no se obtuvo una fracción en la que se concentre la mayoría de etoxiquin, si no que éste se distribuye en la mayoría de ellas. Suponemos que este comportamiento se debe a que el mecanismo que está operando en el proceso de extracción no es tan simple como se planteó al inicio, si no que también, puede estar influyendo en la separación, la formación de puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas, adsorción por centros activos, entre otros, fenómenos provocados por la estructura del etoxiquin y del material de empaque de los cartuchos de fase normal.

Para la determinación cuantitativa de etoxiquin con cada uno de los disolventes, se tomó en cuenta la suma de las áreas que se obtienen de las seis fracciones con hexano y las seis fracciones con metanol. Asumiendo que el etoxiquin que se adiciona al cartucho de EFS se recupera 100 % al final de la extracción; se determina el porcentaje de etoxiquin eluido con cada disolvente; los resultados se muestran en la figura 4.3.4

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



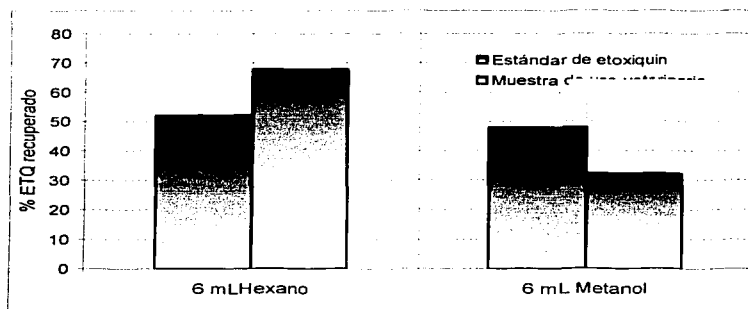


Figura 4.3.4 Porcentaje de extracción de etoxiquin con los volúmenes de disolventes estimados

Se encontró que en ambos casos, el mayor porcentaje de recuperación de etoxiquin, se obtiene de la elución con 6 mL de hexano, lo cual no se esperaba ya que suponíamos en un principio que el etoxiquin presentaría un comportamiento polar debido a su estructura y a resultados anteriores. Los resultados demuestran que no ocurre una separación cuantitativa y eficiente del etoxiquin presente en la muestra a éstas condiciones y que el mecanismo que opera en la extracción no es simple, en este caso suponemos que está predominando un mecanismo de adsorción más fuerte, sin embargo no se obtuvieron otras evidencias experimentales que lo demostraran. A continuación se realizó la EFS de la muestra utilizando una mezcla de hexano y metanol para la elución de los compuestos, los resultados se presentan a continuación.

#### 4.3.1.2 Evaluación de la polaridad de una mezcla de hexano y metanol para una separación eficiente de etoxiquin a partir de la muestra

En los anteriores estudios se demostró que con las condiciones propuestas, no ocurre una separación cuantitativa y eficiente de etoxiquin, por lo que se continuó con la evaluación de una mezcla de hexano y metanol para así favorecer una separación más selectiva. Para ello se realizó la EFS de estándar de etoxiquin con adiciones de 2 mL de las mezclas preparadas de acuerdo a lo descrito en la parte experimental, se colectaron las fracciones del mismo volumen y se evaporaron hasta 0.2 mL, de éstas disoluciones se





inyectó 1  $\mu\text{L}$  al cromatógrafo de gases. Asumiendo que el etoxiquin que se adiciona al cartucho de EFS se recupera 100 % al final de la extracción, se toma en cuenta la suma de áreas de las fracciones colectadas para determinar el porcentaje de etoxiquin eluido; los resultados se muestran en la figura 4.3.5

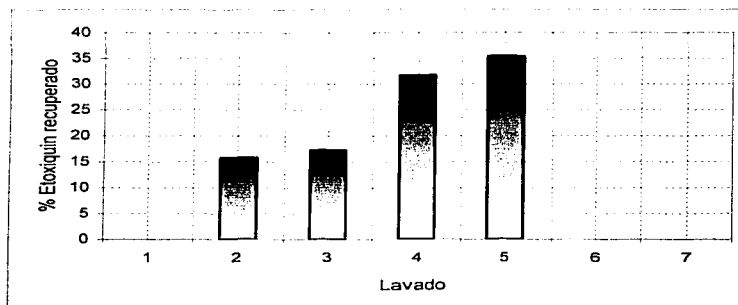


Figura 4.3.5 Porcentaje de estándar de etoxiquin extraído

Se encontró que el mayor porcentaje de recuperación de etoxiquin se logra de la elución con una mezcla de metanol-hexano 1:3; los cromatogramas obtenidos no presentan la zona característica de etoxiquin libre de interferencias por lo que la separación por EFS a éstas condiciones no resultó ser eficiente y poco cuantitativa. Con lo anterior se demuestra que el mecanismo de extracción no es sencillo debido a la complejidad de la muestra.

Los estudios realizados para la evaluación del cartucho de fase amino, arrojaron en resumen los siguientes resultados: a) el uso de hexano, metanol y diferentes mezclas entre ellos lograron altos porcentajes de recuperación de etoxiquin, pero no así una separación eficiente b) los cromatogramas de la muestra presentan interferencias en la zona donde aparece la señal característica de etoxiquin, por lo que una determinación cuantitativa a éstas condiciones sería poco confiable.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN





Debido a esto se continuó con la evaluación del octadecil como material de empaque, fase inversa, con el que se espera favorecer la selección de compuestos presentes en la muestra y de esta forma obtener una separación cuantitativa de etoxiquin libre de interferencias en su análisis y cuantificación por CGC.

#### 4.3.2 Evaluación de fase octadecil, $C_{18}$ (fase inversa)

Para que el estudio de los dos materiales de empaque utilizados en la evaluación de EFS sea comparable, se realizaron las mismas pruebas que en la fase amino. Se inició con la estimación de los volúmenes de disolventes que son necesarios para llevar a cabo el lavado y elución de los componentes de la muestra retenidos en el cartucho de EFS para poder seleccionar así una o varias fracciones donde se encuentre separado al etoxiquin de la muestra; se continuó con un análisis cuantitativo de etoxiquin en la muestra a las mismas condiciones de trabajo. Los resultados se presentan a continuación.

##### 4.3.2.1 Estimación de volúmenes de disolventes para el lavado y elución del cartucho

Se recomienda que para cartuchos de fase inversa, la muestra se encuentre en medio acuoso, pero la muy baja solubilidad de la muestra en éstos medios hace necesario el uso de otros disolventes. Aún en metanol, disolvente con el que se van a realizar los lavados del cartucho, se observó la presencia de un producto insoluble que se adhiere a las paredes del recipiente, lo que dificulta el manejo de la muestra. El producto insoluble en metanol es soluble en hexano y cuando se analiza por CGC no presenta señales características de etoxiquin; sin embargo para evitar que se pierda confiabilidad en el análisis por la falta de homogeneidad, se decidió prepararla en el menor volumen de hexano y así realizar la evaluación de la fase inversa. Para el estudio, lo primero que se realizó fue la adición de metanol colectando las fracciones de 1 mL, hasta no obtener señales significativas por CGC. En ese momento se inició la adición de hexano colectando de igual manera fracciones de 1 mL hasta no obtener señales por CGC. Cada una de las fracciones se evaporó hasta 0.2 mL y se inyectó 1  $\mu$ L al cromatógrafo de gases.





La evolución cuantitativa del proceso se registró con base en el área total de cada cromatograma lo que nos permite conocer el volumen de disolvente que nos asegura la elución y el lavado de los compuestos; los resultados del estudio y un cromatograma típico de la primera fracción con metanol y hexano, se muestran en la figura 4.3.6 y 4.3.7 a y b

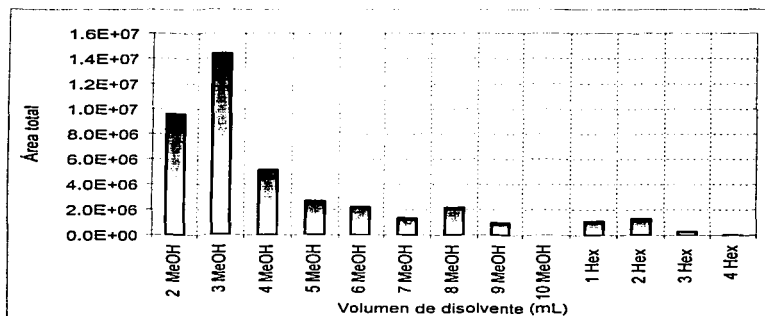


Figura 4.3.6 Estimación de volúmenes de disolvente Metanol y Hexano

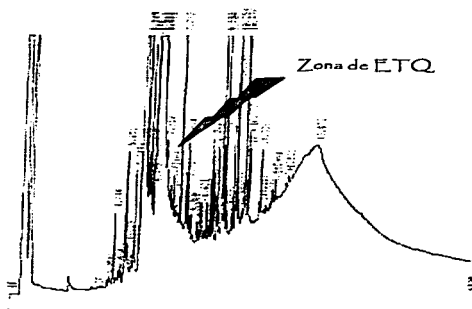


Figura 4.3.7 a Cromatograma típico de fracción con metanol

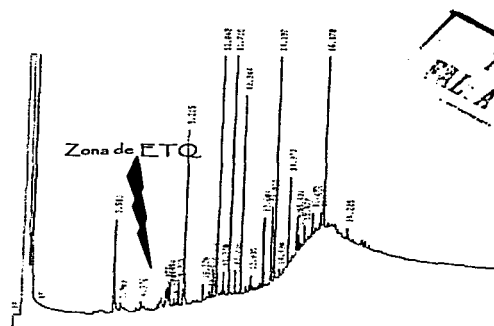


Figura 4.3.7 b Cromatograma típico de fracción con hexano





De acuerdo con la figura 4.3.6, se observó que son suficientes 9 mL de metanol para el lavado del cartucho, ya que el área que se obtiene este volumen, es de mayor significado cuando se comparó con la que se obtiene aún realizando más adiciones de metanol. Después de diez adiciones de metanol, se comenzaron las adiciones de hexano. El área que se obtuvo después de la primera adición de hexano no aumentó considerablemente y se encontró que son suficientes 4 mL de hexano para la elución los compuestos retenidos en el cartucho. Al final del estudio se observó en el cartucho una coloración debida a la muestra, misma que no se pudo eliminar con la adición de otros disolventes. De acuerdo con los resultados, se decide utilizar 6 mL de metanol para el lavado.

En el cromatograma típico de la fracción con metanol, figura 4.3.7 a no se observó una zona libre de interferencias donde aparece la señal característica de etoxiquin, lo que ocasiona que el análisis sea poco confiable; en comparación, en el cromatograma de la fracción de hexano, figura 4.3.7 b no se observó señal característica de etoxiquin. La complejidad de la muestra se demostró una vez más ya que se observa en los cromatogramas un gran número de señales. En el cromatograma de la fracción polar se observó un mayor número de señales, lo que es indicativo de la presencia de un alto contenido de componentes polares en la muestra que eluyen con metanol. Se sugiere que el comportamiento que presenta la muestra en estudio al ser sometida al proceso de EFS con las condiciones mencionadas, es debido a su complejidad. Con la propuesta anterior de los volúmenes de metanol y hexano a utilizar, se continúa con la determinación cuantitativa de etoxiquin en la muestra; los resultados del análisis cuantitativo se presentan a continuación.

#### 4.3.2.1.1 Análisis cuantitativo de etoxiquin contenido en una muestra con volúmenes de disolventes estimados

Para la determinación cuantitativa, se sometió a una EFS de la muestra con los volúmenes de disolventes estimados, se hicieron adiciones de 1 mL en 1 mL hasta un total de 6 mL de metanol y 3 mL de hexano, se colectaron fracciones de 1 mL y se evaporaron hasta 0.2 mL, de éstas disoluciones se inyectó 1  $\mu$ L al cromatógrafo de gases; las áreas obtenidas de cada inyección se relacionaron con el volumen de disolvente; los resultados se muestran en la figura 4.3.8.



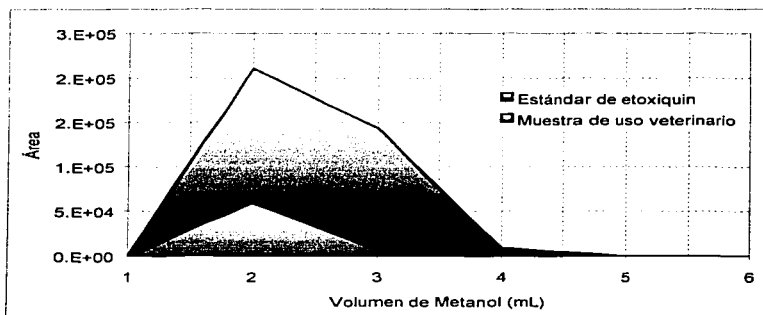


Figura 4.3.8 Perfil de área de señal característica de etoxiquin

Se encontró, que no se obtuvo una fracción en la que se concentre la mayoría de etoxiquin, pero si se logró obtener señal característica de etoxiquin únicamente con la adición de metanol; en el caso de las fracciones con hexano, no se observó señal de etoxiquin. Suponemos que este comportamiento se debe a que el mecanismo predominante que está operando en el proceso de extracción es la formación de puentes de hidrógeno entre el disolvente, el etoxiquin y el material de relleno del cartucho.

Para la determinación cuantitativa de etoxiquin con metanol, se tomó en cuenta la suma de las áreas que se obtienen de las seis fracciones con metanol. Asumiendo que el etoxiquin que se adiciona al cartucho de EFS se recupera 100 % al final de la extracción; se determina el porcentaje de etoxiquin eluido con metanol; los resultados se muestran en la figura 4.3.9

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN





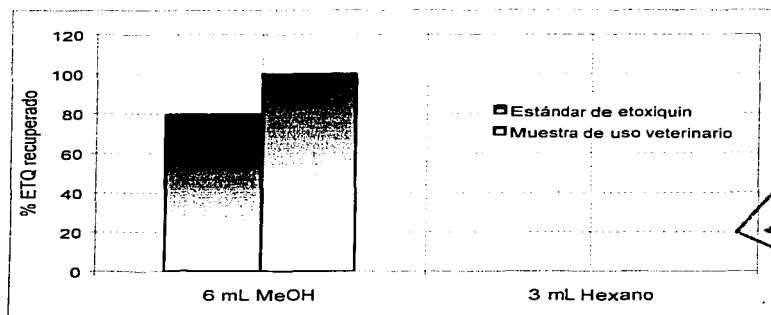


Figura 4.3.9 Porcentaje de extracción de etoxiquin con los volúmenes de disolventes estimados

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Se encontró que en la fracción de metanol se obtuvo un alto porcentaje de recuperación, (80 %) lo cual no se esperaba ya que en el caso de la fase normal se observó lo contrario. Una vez más los resultados demuestran que la complejidad de la muestra es una de las principales limitantes para la técnica de EFS a las condiciones de trabajo.

Los estudios realizados para la evaluación del cartucho de fase octadecil, arrojaron en resumen los siguientes resultados: a) el uso de metanol como disolvente para lavar el cartucho, favorece la elución cuantitativa de etoxiquin pero no una separación eficiente b) el hexano no ayuda a la elución de etoxiquin residual en el cartucho, por lo que existen pérdidas en la cuantificación, c) los cromatogramas de la muestra presentan un gran número de interferencias en la zona donde aparece la señal característica de etoxiquin, por lo que una determinación cuantitativa a éstas condiciones sería poco confiable. La técnica de EFS en dos de sus variantes (fase normal y fase inversa) se evaluó como una técnica de extracción y separación de etoxiquin a partir de la muestra en estudio, sin embargo, no fue la más adecuada debido a que no se logró la eliminación de interferencias de la muestra que se observan en la zona del cromatograma donde aparece la señal característica de etoxiquin, lo que provoca determinaciones poco confiables. El principal problema al cual nos enfrentamos es la complejidad de la muestra, por lo que el mecanismo que ocurre en ambos casos de la EFS, no es sencillo de entender.





Debido a esto, se tuvo la necesidad de evaluar otro material de empaque que puede considerarse dentro de las fases de tipo inversas, ya que tiene un comportamiento similar a éstos. Los cartuchos OASIS con material de relleno de divinilbenceno, N-vinilpirrolidona tienen la ventaja de que son estables en todo el intervalo de pH (0 a 14), por lo que puede utilizarse en este caso ácido clorhídrico hasta 1 M (pH=0) para la elución de la muestra. A continuación se presentan los resultados de la evaluación previa de éstos cartuchos.

#### 4.3.3 Estudios preliminares con cartuchos OASIS (fase inversa)

El material de relleno de los cartuchos OASIS presentan una gran estabilidad aún en condiciones de pH extremas, se aprovecharon éstas ventajas para realizar una EFS de la muestra en estudio utilizando como base y modelo, las condiciones de la metodología de extracción por disolventes que se muestra en la figura 4.2.14. Se acondicionó y estabilizó el cartucho como se describe en la parte experimental del presente trabajo y se adicionó 1 mL de muestra al cartucho y se lavó con 2 mL de ácido clorhídrico 1 M; la fracción acuosa que se obtiene se trata con bicarbonato de sodio y se extrae con 1 mL de TEA. Los cromatogramas que se obtienen de la EFS del estándar de etoxiquin y de la muestra en estudio, se muestran en las figuras 4.4.1 y 4.4.2 respectivamente.

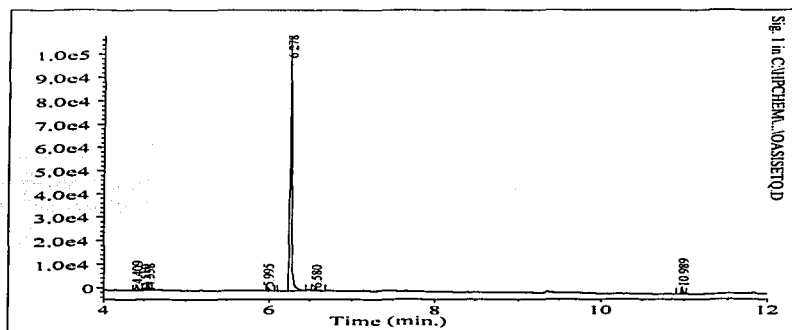


Figura 4.4.1 Cromatograma de la EFS de estándar de etoxiquin en cartuchos OASIS

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



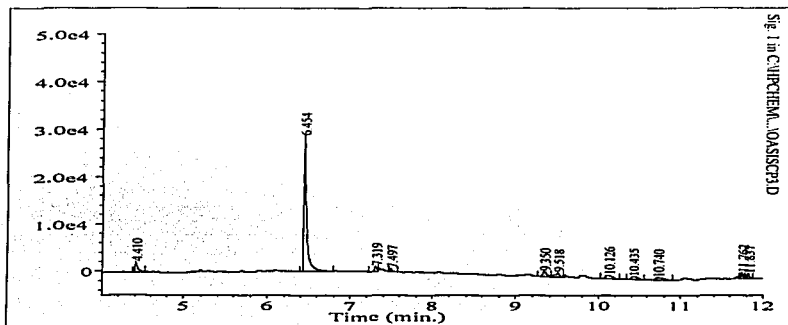


Figura 4.4.2 Cromatograma de la EFS de muestra en estudio en cartuchos OASIS

Se observó que en el caso de la EFS de la muestra con el cartucho OASIS, se obtuvo un cromatograma libre de interferencias en la zona característica de etoxiquin, además con respecto a la generación de residuos, todos los demás componentes de la muestra se quedaron empacados en el cartucho, por lo que se pueden eliminar sin generar residuos líquidos. Debido a que el etoxiquin eluye con el lavado del cartucho, no se pudo favorecer la concentración del analito de interés en el cartucho (que sería lo mejor), sin embargo se puede observar que la recuperación después de la EFS es cuantitativa debido al área que se obtiene.

Con respecto a los resultados previos obtenidos, se recomienda realizar la optimización y validación de la EFS de la muestra en estudio con cartuchos OASIS para la extracción y separación cuantitativa de etoxiquin.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



# **Capítulo 5**

## **Conclusiones**

104-A

## 5.0 CONCLUSIONES

1. Se encontró que la técnica de CAT no es adecuada para la determinación cuantitativa de etoxiquin en la muestra de uso veterinario en estudio, debido a la complejidad que esta presenta y a la falta de selectividad por parte de los parámetros estudiados.
2. La identificación de etoxiquin por la técnica de CAT no es muy eficiente debido a que aunque se encontraron las condiciones de trabajo para su identificación, el tiempo de análisis es largo a comparación de otras técnicas.
3. La separación de etoxiquin en la muestra de uso veterinario en estudio, no es eficiente a las condiciones de trabajo estudiadas, debido a que a pesar que se encontraron las condiciones para una extracción de etoxiquin, no ocurre una separación eficiente de los otros componentes de la muestra, lo que resulta en una técnica poco eficiente y selectiva.
4. La técnica de extracción líquido-líquido optimizada resultó ser la que arrojó mejores resultados en cuanto a la selectividad y eficiencia de la extracción y separación de etoxiquin de la muestra de uso veterinario en estudio, ya que se obtienen muy pocas señales en el análisis por CGC y la señal característica de etoxiquin se encuentra separada de las demás, por lo que resulta sencillo su identificación y determinación cuantitativa.
5. La técnica de extracción de etoxiquin resultó ser una técnica con bajo consumo de reactivos y solventes (aproximadamente de 7 mL), rápida (tiempo de análisis aproximadamente de 18 minutos) además de sencilla (no se requiere mucho manejo de instrumental).

6. La metodología de extracción líquido-líquido seguida de la determinación cuantitativa por CGC propuesta resultó ser lineal, reproducible, con un alto porcentaje de recobro (82%), además presentó un mínimo detectable por debajo de otras técnicas.
7. Se observó que no hay presencia de etoxiquin como tal en la muestra en estudio, por lo que se realizaron las determinaciones cuantitativas de su producto de degradación (2,4-dimetil-6-etoxiquinolina) que presenta la misma actividad como antioxidante que el etoxiquin.
8. La técnica de EFS en cartuchos OASIS arrojó los mejores resultados en cuanto a la selectividad y eficiencia de la extracción. Se debe realizar la validación de esta técnica ya que tiene la ventaja sobre de las demás técnicas estudiadas, de no generar residuos y el tiempo de análisis es corto.

## RECOMENDACIONES

- La validación de la técnica de extracción líquido-líquido debe realizarse con estándares certificados tanto de etoxiquin como del producto de degradación 2,4-dimetil-6-etoxiquinolina y deberá reportarse el contenido de acuerdo a la presencia de uno, otro o ambos compuestos.
- En cuanto a la técnica de EFS con cartuchos OASIS se recomienda realizar más estudios que favorezcan el aumento del factor de concentración del etoxiquin para su determinación cuantitativa eficiente.

# **Capítulo 6**

# **Bibliografía**

1060 A

## 6.0 BIBLIOGRAFÍA.

1. Owen R. Fennema; *Química de los Alimentos*; Editorial Acribia.
2. Francisco Hernández Luis, *Temas de Toxicología*, Departamento de Farmacia, Facultad de Química, UNAM.
3. Ernst Lidner; *Toxicología de los Alimentos*; Editorial Acribia S.A, Zaragoza, España; 1995.
4. Salvador Badui Dergal; *Química de los Alimentos*; Editorial Alambra.
5. Takayuki Shibamoto; *Introducción a la Toxicología de los Alimentos*; Editorial Acribia, Zaragoza, España 1996.
6. M.L. López and M. Riba; Residue Levels of Ethoxyquin, Imazalil, and Iprodione in Pears under Cold-Storage Conditions; *J. Agric. Food Chem.*; 1999, **47**,3328-3236.
7. T. Choy, N.J. Alicino, H. C. Klein, J.J. Quattrone; Determination of Ethoxyquin by Ultraviolet Spectrophotometry; *Agric. Food Chem.*; 1963, **11** (4), 340-342.
8. D. Brannegan, M. Ashraf-Khorassani; L.T.Taylor; High-Performance liquid Chromatography Coupled with Chemiluminescence Nitrogen Detection for the Study of Ethoxyquin Antioxidant and Related Organic Bases; *J. Chrom. Science*; 2001, **39**, 217-221.
9. J. M. VanDeren, E.G. Jaworski; Ethoxyquin (Santoquin) in Eggs, Chicken Muscle, and Chicken Liver; *J. Of the A.O.A.C.*; 1966, **49** (4), 712-714.
10. R.S: Gordon, R. A. Conkin, L.J. Machlin; Determination of Ethoxyquin in Feeds; *J. Of the A.O.A.C.*; 1964, **47** (3), 512-516.
11. T. Choy, J. J. Quattrone, N.J. Alicino; A Gas Chromatography Method for the Determination of Antioxidants BHA, BHT and Ethoxyquin in Aqueous and in Hydrocarbon Soluble Samples; *J. of Chrom.*; 1963, **12**,171-177.
12. S. Thorisson, F.D. Gunstone, R. Hardy; Some oxidation products of ethoxyquin including those found in autoxidising systems; *Chemistry and Physics of Lipids*; 1992, **60**, 263-271.
13. Brannegan D.R.; *Thesis to Master of Science in Chemistry*, 2000; Bracksburg, Virginia.





14. John Mc Murry, *Química Orgánica*; 1994; Grupo Editorial Iberoamérica; México.
15. P. He, R.G. Ackman; *J. of Food Science*; 2000; **65** (8)1311-1313.
16. James L. Little; *J. of Chrom A*;1999, **844**, 1-22.
- 17 P. Sandra, Fundamentals Resolutions- Definition and Nomenclature; *J. Of High Resolution Chromatography*; February 1989, **Vol 12**.
- 18 P. Sandra, Fundamentals Resolutions-Column Efficiency; *J. Of High Resolution Chromatography*; May 1989, **Vol 12**.
- 19 Hiroyuki Kataoka, Derivatization reactions for the determination of amines by gas chromatography and their applications in environmental analysis; *J. of Chromatography A*, **733**, 1996, 19-34.
- 20 Buldini L. and Ricci L; Recent Applications of Sample Preparation Techniques in Food Analysis *J of Chromatography A*, **896**, 2002, 265-273.
- 21 T.S. Oostdyk, R.L. Grob, J.L.Snyder and M.E McNally; Solid-Phase Extraction of Primary Amines from Aqueous Samples; Comparison with Liquid-Liquid Extraction Techniques; *J. Environ.Sci.Health A*, 1994, **29(8)** 1607-1628.
- 22 Cato Brede, Ingun Skjevrek, Hallgeir Herikstad; Determination of primary aromatic amines in water food simulant using solid-phase analytical derivatization followed by gas chromatography coupled with mass spectrometric; *J of Chromatography A*, 2003, **983** 35-42.
- 23 Ethoxyquin in Animal Feed; *AOAC Official Methods of Analysis 963.07*; Chapter 4.
- 24 T. Choy, N.J. Alicino, H. C. Klein, J.J. Quattrone; Determination of Butylated Hydroxyanisole, Butylated Hydroxytoluene, and Ethoxyquin in Hydrocarbon-Soluble Samples; *Agric. Food Chem.*, 1963, **11 (6)**, 496-498.
- 25 J.M. Van Deren, Jr and E.G. Jaworski; Collaborative Study of the Determination of Ethoxyquin in Chick Tissue and Eggs; *J. Of the A.O.A.C.*; 1967, **50 (4)**, 844-847.
- 26 S. Thorisson, F.D. Gunstone, R. Hardy; The Antioxidant Properties of Ethoxyquin and of Some of its Oxidation Products in Fish Oil and Meal; *JAOCS*, 1992, **Vol 69 (8)**, 263-271.



- 27 J.A. Prieto, R.M. Alonso, R.M. Jimenez and A. Blanco; Solid-Phase Extraction and High-Performance Liquid Chromatography Applied to the Determination of Quinapril and its Metabolite Quinaprilat in Urine; *J. of Chromatographic Science*; April 2001, Vol 39, 153-159.
- 28 Marianne E. Walsh, Thomas Ranney; Determination of Nitroaromatic, Nitramine, and Nitrate Ester Explosives in Mater Using Solid-Phase Extraction and Gas Chromatography-Electron Capture Detection: Comparison With High-Performance Liquid Chromatography; *J. of Chromatographic Science*; August 1998, Vol 36, 406-416.
- 29 R.A. Meyers; *Encyclopedia of Analytical Chemistry, Application, Theory and Instrumentation*; John Wiley & Sons; 2000, Vol 12.
- 30 James F. Lawrence, *Organic Trace Analysis by Liquid Chromatographic*; Academic Press; N.Y. 1981.
- 31 Daniel R. Knapp; *Handbook of Analytical Derivatitation Reactions*; John Wiley & Sons; N.Y. 1979.
- 32 Message, M. G.; *Practical aspect of Gas Chromatography/ Mass spectrometry*; John Willey & Sons; New York; 1984.
- 33 Skoog, Holler, Nieman; *Principios de Análisis Instrumental*; 5ª Edición; Mc Graw Hill; 2001; Madrid; España.
- 34 Pereira, A. S., Aquino Neto F. R.; *J. Of Chromatographic Science*; 2000, 38, 369-376.
- 35 Grob K, Grob G, Grob K Jr; *J of Chromatography*; 1981, 219, 13-20.
- 36 Willard H.H, Merritt Jr L, Dean J, Settle.; *Métodos Instrumentales de Análisis*; Grupo Editorial Iberoamericana; California; 1991.
- 37 Silverstein R, Bassier G, Morrill T; *spectrometric Identification of Organic Compounds*; John Wiley & Sons; 4<sup>th</sup> Edition; USA; 1981.
- 38 L.D. Field, S. Sternhell; J.R. Kalman; *Organic Structure from Spectra*; Second Edition; John Willey & Sons; New York; 1996.
- 39 James N Miller, Jane C Miller; *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*; 4ª Edición; Prentice Hall; 1999.





- 40 Murray R Spiegel; *Estadística*; Serie Schaum Mc Graw Hill; México; 1980.
- 41 [www.inchem.org](http://www.inchem.org) (Chemical Safety Information from Intergovernmental Organization)
- 42 [www.rae.es](http://www.rae.es)
- 43 [www.fda.com](http://www.fda.com)

**Anexos**

110-A



## ANEXO I

### Análisis Estadístico

En las determinaciones analíticas, es habitual que se elabore una curva de calibración con la que se pueda determinar la concentración de un analito en una muestra problema; su elaboración es sencilla, sólo basta con preparar una serie de disoluciones de las cuales se tenga conocimiento exacto de su concentración y medirlos en el instrumento analítico bajo las mismas condiciones de trabajo que la muestra. Con los resultados obtenidos se debe elaborar un gráfico de calibración donde se coloquen en el eje de las  $y$  la respuesta medida y en el eje de las  $x$  la concentración o cantidad de analito, de ésta forma los errores que se cometan serán sólo sobre la respuesta medida. Una vez establecida la gráfica de calibración, puede obtenerse la concentración de analito por interpolación en cualquier material de ensayo. Sin embargo, el método de curva de calibración, plantea varias cuestiones estadísticas importantes: ¿es lineal la gráfica de calibrado?, ¿cuáles son los errores y límites de confianza de la pendiente y ordenada al origen de la recta?, ¿cuáles son los errores y límites de confianza de la concentración determinada?, etcétera; éstas preguntas se pueden contestar determinando ciertos parámetros estadísticos.

Para definir si la gráfica de calibración es lineal o no, se debe en primer lugar estimar la bondad con la que se ajustan los puntos experimentales a una línea recta, esto se determina calculando el coeficiente de correlación  $r$  con la ecuación A1.1

$$r = \frac{\sum_i \{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\left\{ \left[ \sum_i (x_i - \bar{x})^2 \right] \left[ \sum_i (y_i - \bar{y})^2 \right] \right\}^{\frac{1}{2}}} \quad \text{ecuación A1.1}$$

donde  $\bar{x}$  y  $\bar{y}$  representan el promedio de las concentraciones y las mediciones respectivamente.





Si este tiene un valor de  $-1$ , se dice que la gráfica describe una correlación lineal inversa entre la concentración y la respuesta del instrumento; cuando  $r=+1$ , se dice que hay una correlación lineal directa, cuando no existe correlación, el valor de  $r$  es cero. Aunque los coeficientes de correlación son simples de calcular, son con facilidad mal interpretados, ya que se puede generar un valor de  $r$  muy cercano a 1 aún cuando los datos muestren un carácter no lineal, por lo que el análisis del coeficiente de correlación debe estar acompañado siempre de una inspección visual del gráfico de calibrado, de manera tal que ambas, suelen ser suficientes para asegurar que se tiene una relación lineal útil en las determinaciones.

Sin embargo, en algunas ocasiones se obtienen valores de  $r$  mucho más bajos, por lo que es necesario emplear un contraste estadístico adecuado para ver si el coeficiente de correlación es realmente significativo, es decir, hacer una prueba de hipótesis sobre este valor.

Habiendo ya establecido una relación lineal sobre el gráfico de calibración, es necesario minimizar la desviaciones sobre la respuesta medida, debido a que algunas de éstas desviaciones serán positivas y otras negativas, es razonable minimizar la suma de los cuadrados de los residuos ya que así todos los valores serán positivos (método de mínimos cuadrados). Para ello deberá determinarse el valor de la pendiente ( $m$ ) y la ordenada al origen ( $b$ ) de la recta con las ecuaciones A1.2 y A1.3 respectivamente.

$$m = \frac{\sum_1 \{(x_1 - \bar{x})(y_1 - \bar{y})\}}{\sum_1 (x_1 - \bar{x})^2} \quad \text{ecuación A1.2}$$

$$b = \bar{y} - m\bar{x} \quad \text{ecuación A1.3}$$

El valor de la pendiente ahora nos dará idea también de la sensibilidad de las mediciones realizadas, mientras que el valor de  $b$  nos dará información acerca de la respuesta del equipo cuando no hay presente analito. En principio se espera que la ordenada al origen de un gráfico de calibración sea cero, sin embargo esto no ocurre siempre, por lo que entonces se deberá realizar una prueba de hipótesis sobre la ordenada al origen para verificar si la diferencia del valor esperado es significativo.





Debido a que los errores aleatorios en los valores de la pendiente y la ordenada al origen son importantes deberán determinarse conforme la ecuación A1.4

$$S_{y_x} = \sqrt{\frac{\sum_1 (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}} \quad \text{ecuación A1.4}$$

donde  $S_{y_x}$  es el estimador de los errores aleatorios en la dirección  $y$ ,  $\hat{y}_i$  son los puntos sobre la recta de regresión calculada correspondientes a los valores individuales de  $x$ , es decir, los valores de  $y$  ajustados. Donde con el valor de  $S_{y_x}$  se pueden calcular las desviaciones estándar sobre la pendiente ( $S_m$ ) y la ordenada al origen ( $S_b$ ) de acuerdo con las ecuaciones A1.5 y A1.6 respectivamente:

$$S_m = \frac{S_{y_x}}{\sqrt{\sum_1 (x_i - \bar{x})^2}} \quad \text{ecuación A1.5}$$

$$S_b = S_{y_x} \sqrt{\frac{\sum_1 x_i^2}{n \sum_1 (x_i - \bar{x})^2}} \quad \text{ecuación A1.6}$$

Los valores de  $S_b$  y  $S_m$  se pueden utilizar de manera usual para estimar los límites de confianza de ambos.

Ya establecidos y calculados los parámetros estadísticos arriba mencionados, se puede afirmar con un cierto grado de error acerca de la linealidad de una recta de calibración y la información que nos interesa relacionada con su pendiente y ordenada al origen de acuerdo al análisis realizado. A continuación se presentan los resultados estadísticos para las curvas de calibración elaboradas en el presente proyecto.

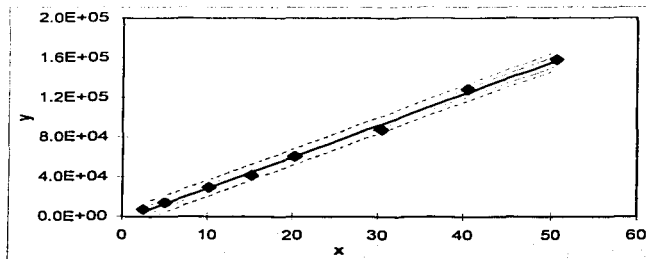
Se realizó la evaluación estadística de los parámetros de la función del ajuste lineal utilizando plantillas elaboradas en Microsoft Excel proporcionadas por el M. en C. Francisco Rojo Callejas; los resultados obtenidos se muestran a continuación.





## A1.1 Análisis cuantitativo por CGCATC

x C (mg/L)	y=respuesta Area
2.531	7018
5.062	14009
10.124	29383
15.186	41214
20.248	60500
30.372	87781
40.496	127930
50.62	158004



Resultados del ajuste lineal:

Riesgo de error =	5	%
Número de datos =	8	
Ordenada al origen =	-3000	+/- -4000
Pendiente =	3200	+/- 200
Coefficiente de correlación =	0.99866065	
Riesgo de que no sea recta =	8.9344E-08	%
Cantidad Mínima Detectable =	2.69645338	C (mg/L) (ppm)

Para que las determinaciones cuantitativas por CGCAT se puedan realizar tomando en cuenta el Factor de Respuesta (Fr), se debe hacer una prueba de hipótesis sobre la ordenada al origen para verificar que su valor se puede considerar como cero y así llevar a cabo las determinaciones con la relación:

$$\text{Respuesta} = \text{Fr} * \text{Concentración}$$

ecuación A1.7

Para ello se determinaron los siguientes parámetros necesarios:

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**







Grados de libertad =	6
t student =	2.44691364
Media x =	21.829875
Media y =	65729.875
Ordenada al Origen =	-3318.3647
Desviación estándar de b =	1816.77785
Pendiente =	3163.01581
Desviación estándar de m =	66.8998062

Se realizó la prueba de hipótesis sobre la ordenada al origen para los dos casos de interés de la hipótesis alterna (H1), los resultados se resumen en la siguiente tabla:

Hipótesis sobre la ordenada. Valor de b estimado = -3318.36479 , riesgo $\alpha=0.05$				
<b>Ho: b = 0</b>				
Posibles hipótesis alternas:	t de Student	t de tablas	Resultado:	Decisión:
<b>H1: b &gt; 0</b>	-1.82651103	-1.94318091	igual	<b>Aceptar Ho</b>
<b>H1: b <math>\neq</math> 0</b>	-1.82651103	2.44691364	igual	<b>Aceptar Ho</b>

Con los resultados de la prueba de hipótesis se encontró que el valor de la ordenada al origen que se obtiene de la curva de calibración por CGCAT, no es significativamente diferente de cero.

De acuerdo con los resultados, se observó en la gráfica de calibración, que los puntos experimentales guardan una relación lineal directa, esto se comprobó determinando el riesgo de que no sea una recta y las desviaciones estándar para la ordenada al origen y la pendiente. Además se realizó una prueba de hipótesis sobre la ordenada al origen, con ella se encontró que la determinación de la concentración de etoxiquin por CGCAT se puede hacer con la ecuación A1.7.

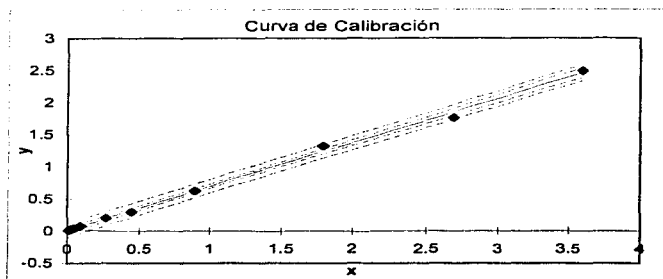
**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**





## A1.2 Linealidad de las determinaciones cuantitativas.

x C (mg/L)	y=respuesta Area
0.009	0.01693945
0.027	0.02892796
0.045	0.04635036
0.09	0.07715748
0.27	0.20316433
0.45	0.2985958
0.9	0.62412716
1.8	1.32243415
2.7	1.76587357
3.6	2.49137236



## Resultados del ajuste lineal:

Riesgo de error =	5	%
Número de datos =	10	
Ordenada al origen =	0.01	+/- 0.04
Pendiente =	0.68	+/- 0.03
Coefficiente de correlación =	0.998	
Riesgo de que no sea recta =	2.2634E-11	%
Cantidad Mínima Detectable =	0.16001043	C (mg/L) (ppm)

Para que las determinaciones cuantitativas por CGC después de la extracción por disolventes de la muestra se puedan realizar tomando en cuenta el Factor de Respuesta (Fr), se debe hacer una prueba de hipótesis sobre la ordenada al origen para verificar que su valor se puede considerar como cero y así llevar a cabo las determinaciones de acuerdo a la ecuación A1.7.

Para ello se determinaron los siguientes parámetros necesarios:

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN





Grados de libertad =	8
t student =	2.30600563
Media x =	0.9891
Media y =	0.68749426
Ordenada al Origen =	0.01410878
Desviación estándar de b =	0.0179807
Pendiente =	0.68080627
Desviación estándar de m =	0.01146726

Se realizó la prueba de hipótesis sobre la ordenada al origen para los dos casos de interés de la hipótesis alterna (H1), los resultados se resumen en la siguiente tabla:

Hipótesis sobre la ordenada. Valor de b estimado = 0.01410878 , riesgo $\alpha=0.05$				
<b>Ho: b = 0</b>				
Posibles hipótesis alternas:	t de Student	t de tablas	Resultado:	Decisión:
<b>H1: b &gt; 0</b>	0.78466263	1.85954832	igual	<b>Aceptar Ho</b>
<b>H1: b <math>\neq</math> 0</b>	0.78466263	2.30600563	igual	<b>Aceptar Ho</b>

Con los resultados de la prueba de hipótesis se encontró que el valor de la ordenada al origen que se obtiene de la curva de calibración por CGC, no es significativamente diferente de cero.

De acuerdo con los resultados, se observó en la gráfica de calibración, que los puntos experimentales guardan una relación lineal directa, esto se comprobó determinando el riesgo de que no sea una recta y las desviaciones estándar para la ordenada al origen y la pendiente. Con éstos resultados se puede afirmar que la metodología de cuantificación de etoxiquin por CGC es lineal en el intervalo de concentraciones que se trabajó. Además se realizó una prueba de hipótesis sobre la ordenada al origen, con ella se encontró que la determinación de la concentración de etoxiquin se puede hacer con la ecuación A1.7.

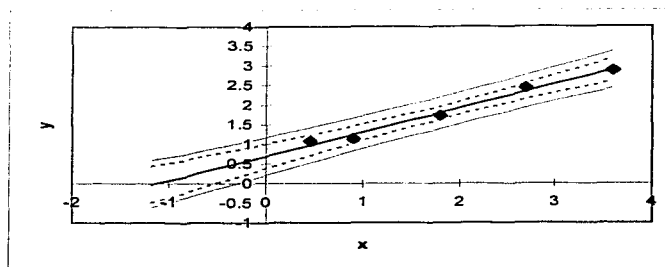
**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**





## A1.3 Linealidad de la metodología propuesta.

x C (mg/L)	y=respuesta Area
0.45	1.08133
0.9	1.1270505
1.8	1.72622167
2.7	2.43492063
3.6	2.87274328



## Resultados del ajuste lineal:

Riesgo de error =	5%
Número de datos =	5
Ordenada al origen =	0.7 +/- 0.008
Pendiente =	0.6 +/- 0.1
Coefficiente de correlación =	0.99210116
Riesgo de que no sea recta =	0.065412%
Cantidad de analito =	1.17 +/- 0.96

Debido a que la linealidad de la metodología propuesta se determinó por una curva de adiciones patrón, es de importancia que se verifique la confiabilidad de la pendiente y la ordenada al origen debido a que de ambos depende la determinación de la cantidad de etoxiquin presente en una muestra (por extrapolación de la recta hasta  $y=0$ ).

Para ello se determinaron los siguientes parámetros necesarios:

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN





Grados de libertad =	3
t student =	3.18244929
Media x =	1.89
Media y =	1.84845322
Ordenada al Origen =	0.69418692
Desviación estándar de b =	0.09869276
Pendiente =	0.61072291
Desviación estándar de m =	0.04458257

Se realizó la prueba de hipótesis sobre la ordenada al origen para los dos casos de interés de la hipótesis alterna (H1), los resultados se resumen en la siguiente tabla:

Hipótesis sobre la ordenada. Valor de b estimado = 0.01023302 , riesgo $\alpha=0.05$				
<b>Ho: b = 0</b>				
Posibles hipótesis alternas:	t de Student	t de tablas	Resultado:	Decisión:
<b>H1: b &gt; 0</b>	7.03381774	2.35336302	mayor	<b>Rechazar Ho</b>
<b>H1: b <math>\neq</math> 0</b>	7.03381774	3.18244929	diferente	<b>Rechazar Ho</b>

De acuerdo con los resultados, se observó en la gráfica de calibración por adiciones patrón, que los puntos experimentales guardan una relación lineal directa, esto se comprobó determinando el riesgo de que no sea una recta y las desviaciones estándar para la ordenada al origen y la pendiente. Con éstos resultados se puede afirmar que la metodología de extracción por disolventes del etoxiquin presente en una muestra es lineal en el intervalo de concentraciones que se trabajó. Además se realizó una prueba de hipótesis sobre la ordenada al origen, con ella se encontró que el valor es significativamente diferente de cero que es lo que se espera en este tipo de curvas de calibración. Se determinó que la cantidad de etoxiquin en la muestra es de 1.17 ppm  $\pm$  0.96.

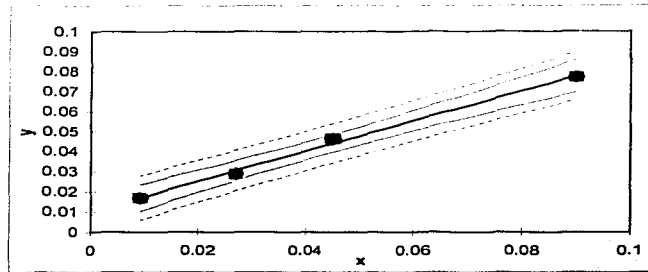
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN





## A1.4 Límite de detección.

x C (mg/L)	y=respuesta Area
0.009	0.01693945
0.027	0.02892796
0.045	0.04635036
0.09	0.07715748



## Resultados del ajuste lineal:

Riesgo de error =	5%
Número de datos =	4
Ordenada al origen =	0.01 +/- 0.008
Pendiente =	0.8 +/- 0.1
Coefficiente de correlación =	0.99796675
Riesgo de que no sea recta =	0.2035317%
Cantidad Mínima Detectable =	0.01420677 C (mg/L) (ppm)

Para la determinación del límite de detección es de vital importancia que se conozca las desviaciones sobre la ordenada al origen, ya que el valor que se va a calcular es muy cercano a este, para ello se determinaron los siguientes parámetros necesarios:

Grados de libertad =	2
t student =	4.30265573
Media x =	0.04275
Media y =	0.04234382
Ordenada al Origen =	0.01023302
Desviación estándar de b =	0.00177359
Pendiente =	0.75112971
Desviación estándar de y =	0.03392136

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN





Se realizó la prueba de hipótesis sobre la ordenada al origen para los dos casos de interés de la hipótesis alterna ( $H_1$ ), los resultados se resumen en la siguiente tabla:

Hipótesis sobre la ordenada. Valor de b estimado = 0.01023302 , riesgo $\alpha=0.05$				
<b><math>H_0: b = 0</math></b>				
Posibles hipótesis alternas:	t de Student	t de tablas	Resultado:	Decisión:
<b><math>H_1: b &gt; 0</math></b>	5.76967099	2.91998731	mayor	<b>Rechazar <math>H_0</math></b>
<b><math>H_1: b \neq 0</math></b>	5.76967099	4.30265573	diferente	<b>Rechazar <math>H_0</math></b>

Con los resultados de la prueba de hipótesis se encontró que el valor de la ordenada al origen que se obtiene, no es significativamente diferente de cero, por lo que la determinación del límite de detección se hará con un 72 % de confiabilidad. Cabe recordar que el límite de detección es una cantidad teórica que si se dice que hay podemos cometer el riesgo de que realmente no este presente.

NO CON  
FALLA DE ORIGEN





## ANEXO 2.

### Espectrometría de Masas

**Ión molecular:** ( $M^+$ ) Especie que resulta de la remoción de un solo electrón de la molécula en estado gaseoso, su relación masa / carga ( $m/z$ ) representa el peso molecular del compuesto.

**Fragmento común :** Especie característica que resulta de la fragmentación en cadena de del ión molecular de una molécula con cierto grupo funcional en particular.

**Pico base:** Especie más abundante que resulta de la fragmentación del ión molecular.

Los espectros de masas se obtienen generalmente a una energía del haz de electrones equivalente a 70 electrón-volts, el fenómeno que se presenta a este valor de energía es la remoción de un electrón de la molécula en fase gaseosa para formar un ión molecular con carga positiva; cuando la carga puede localizarse se indica en el átomo + o bien si no presentan carga, se representa con un punto si es un electrón non. Algunos de los iones moleculares que se forman, son muy estables y llegan al detector, observándose de ésta manera una señal que corresponde al peso molecular del compuesto; sin embargo, muchos de los iones moleculares tienen tiempos de vida muy cortos ( $10^{-10}$  a  $10^{-3}$  segundos) ya que dan lugar, en el caso más sencillo, a un fragmento cargado positivo y un radical; de la misma forma cada uno puede descomponerse para dar lugar a más fragmentos menores.

Un espectro de masas es la representación de las masas de los fragmentos cargados positivamente en función de su abundancia relativa; el pico más intenso del espectro es el pico base y tiene asignado un valor de 100 % en la abundancia. La representación del espectro puede ser tabular o en una gráfica, esta última tiene la ventaja de presentar modelos característicos de grupos funcionales que pueden reconocerse fácilmente dándonos información acerca de la molécula a simple vista del espectro.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN







Como primera impresión, el hecho de fragmentar una molécula con un exceso de electrones, podría parecer un procedimiento exagerado para la simple identificación de una estructura molecular. La probabilidad de ruptura de un enlace en particular esta relacionada con la resistencia del enlace, la posibilidad de las transiciones de baja energía y la estabilidad de los fragmentos con carga y sin carga que se forman en el proceso de fragmentación; debido que el analizador de masas se encuentra al alto vacío, existen muy pocas colisiones de fragmentos y por lo tanto principalmente se tienen las descomposiciones unimoleculares.

Existen reglas generales de acuerdo a los conocimientos de química orgánica, que ayudan en la interpretación de los espectros de masas:

1. La altura del ion molecular generalmente disminuye conforme aumenta el peso molecular en una serie homóloga.
2. Las rupturas se favorecen en los átomos de carbono ramificados, cuanto mayor es la ramificación, mayor es la probabilidad de la ruptura.
3. Por lo general, el sustituyente más pesado se elimina con más facilidad, debido a que su radical puede estabilizarse mejor por la deslocalización de los electrones.
4. Los enlaces dobles, estructuras cíclicas, anillos aromáticos y heteroaromáticos estabilizan el ion molecular por lo que aumentan su probabilidad de aparición.
5. Los anillos saturados, tienden a perder las cadenas laterales en el enlace alfa y la carga positiva permanece en el fragmento anular.
6. En los compuestos aromáticos sustituidos por alquilos, la ruptura es muy probable en el enlace beta con respecto al anillo, proporcionando así el ion tropilio que es muy estabilizado por resonancia.
7. Los enlaces C-C siguientes a un heteroátomo frecuentemente quedan sometidos a la ruptura, dejando la carga en el fragmento que contiene al heteroátomo, debido a que sus electrones libres la proporcionan mayor estabilidad por resonancia.
8. La ruptura frecuentemente va asociada con la eliminación de pequeñas moléculas neutras estables como monóxido de carbono, agua, amoniac, cianuro de hidrógeno, etcétera

TESIS CON  
FALLA DE CALIFICACIÓN





A menudo durante la fragmentación pueden ocurrir rearrreglos intermoleculares de los fragmentos que ayudan en su estabilidad, éstos rearrreglos implican comúnmente la migración de átomos de hidrógeno, en moléculas que contienen heteroátomos. Los picos que se obtienen por un rearrreglo pueden identificarse al considerar el número de relación  $m/z$  de los iones fragmento y sus iones moleculares correspondientes; la escisión simple (sin arreglo) de un ión molecular de número par, proporciona un fragmento de número non y en caso contrario, un número par. La observación de un ión fragmento cuya masa es una unidad distinta de la esperada, indica que el arreglo del hidrógeno ha acompañado a la fragmentación.

El ion molecular de las aminas es un número non, en el caso de aminas alifáticas, este es bastante débil y, en las aminas de cadena larga o ramificadas, no es detectable; en comparación en las aminas cíclicas es muy intenso. La escisión primaria de los enlaces siguientes al átomo de nitrógeno, origina la pérdida de un átomo de hidrógeno alfa para resultar en un pico  $M^+-1$  intenso, o en la apertura del anillo; este último caso va seguido de la eliminación de etileno para dar lugar al pico base de 43  $m/z$  y posteriormente mediante la pérdida de un hidrógeno 42  $m/z$ . El  $M^+$  de una monoamina aromática es intenso, la pérdida de uno de los átomos de hidrógeno amínicos de la anilina proporciona un pico  $M^+-1$  moderadamente intenso y la pérdida de una molécula neutra de HCN seguida de la pérdida de un átomo de hidrógeno proporciona picos notables de 66 y 65  $m/z$  respectivamente. En el caso de las alquilaminas, la escisión del enlace C-C siguiente al átomo de nitrógeno es predominante, es decir el heteroátomo controla la escisión.

El ion molecular de los compuestos heteroaromáticos es intenso, la escisión del enlace beta con respecto al anillo constituye la regla general; en la piridina la posición de la sustitución determina la facilidad de la escisión del enlace beta, esto se debe a la localización de la carga del ion molecular en un heteroátomo y no a su estructura anular. La escisión del enlace beta C-C en las alquilpiridinas depende de la posición de la sustitución anular, siendo más pronunciada cuando el grupo alquilo se encuentra en posición 3; un grupo alquilo de más de tres átomos de carbono en la posición 2 puede quedar sometido al rearrreglo de un átomo de hidrógeno al nitrógeno anular.





## A2.1 Etoxiquin

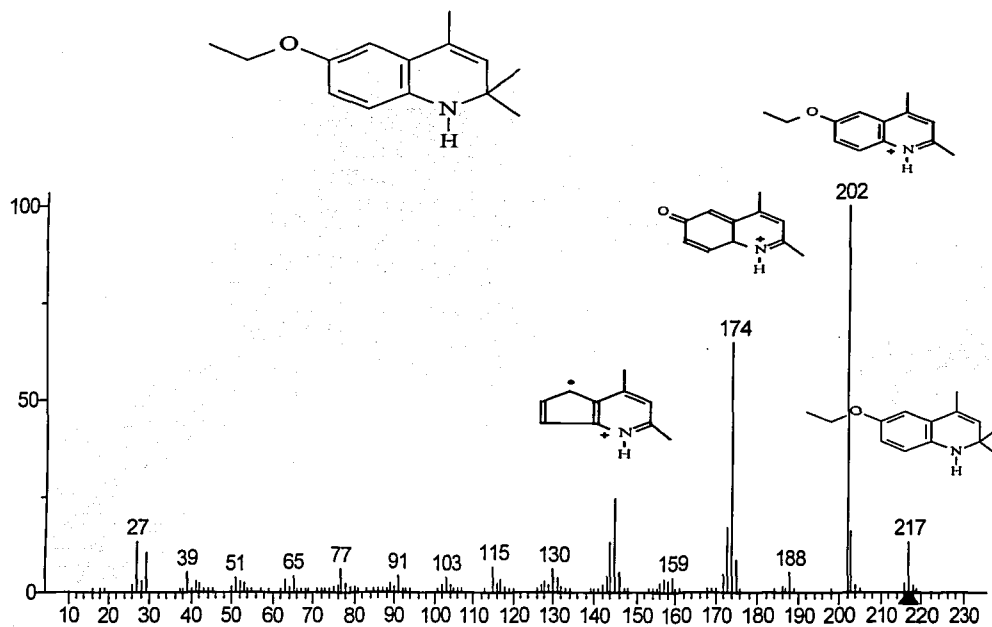


Figura A2.1 Espectro de masas de etoxiquin, comparación realizada con la biblioteca NIST 2.0, indicando fragmentos característicos

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



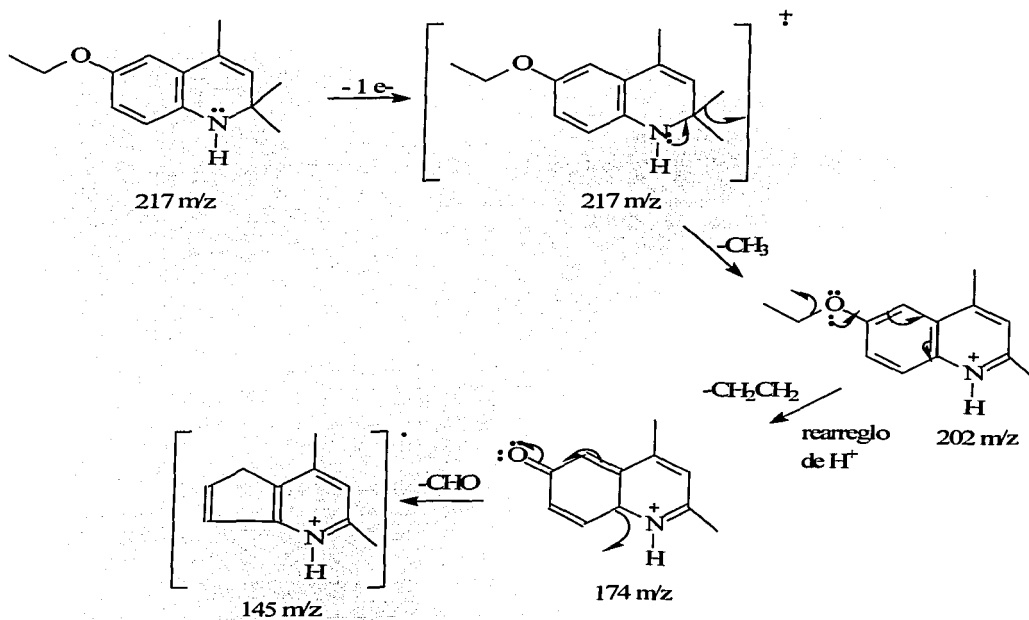


Figura A2.2 Posible mecanismo de fragmentación del etoquin





## A2.2 Etoxiquinolina

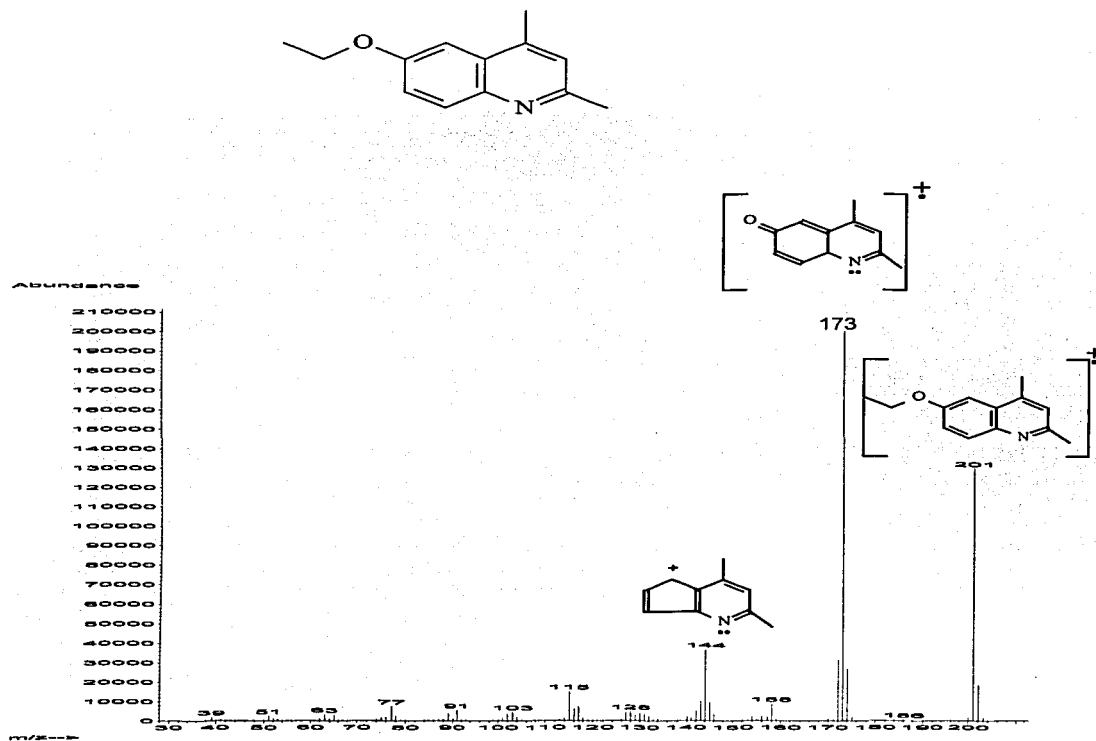


Figura A2.3 Espectro de masas de la etoxiquinolina comparado con la referencia <sup>13</sup> indicando fragmentos característicos

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

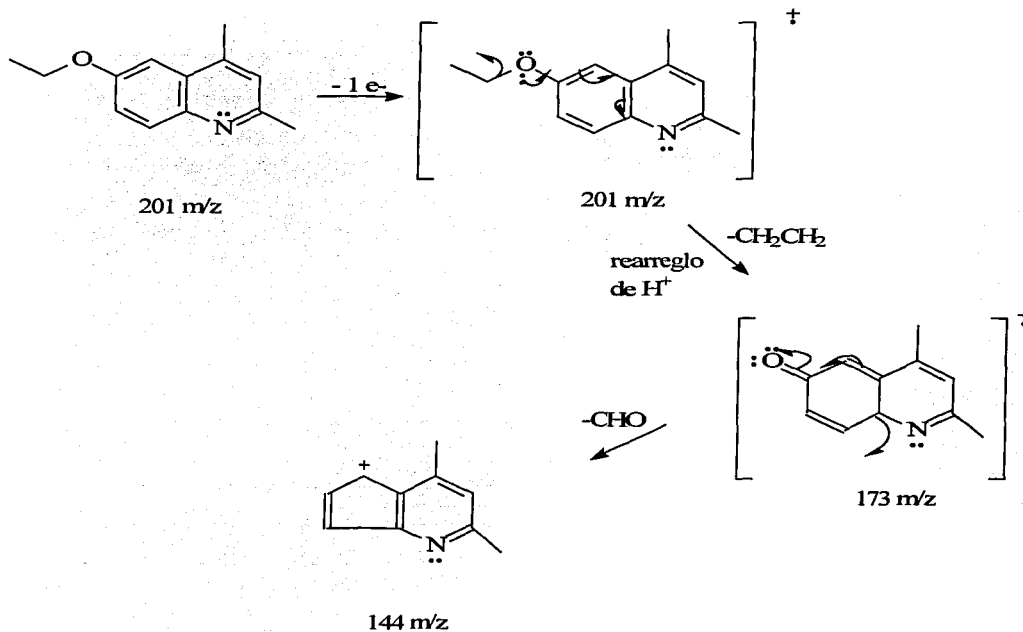


Figura A2.4 Posible mecanismo de fragmentación de la etoxiquinolina

ESTRUCTURA CON  
FALLA DE ORIGEN





## ANEXO 3.

### Espectrofotometría de Ultravioleta

**Cromóforo:** Grupo insaturado que es responsable de la absorción electrónica.

**Auxócromo:** Grupo saturado que altera tanto la longitud de onda como la intensidad del máximo de absorción.

**Desplazamiento batocrómico:** Desplazamiento de la absorción a una mayor longitud de onda debido al disolvente o sustituyente.

**Desplazamiento Hipsocrómico:** Desplazamiento de la absorción a una menor longitud de onda debido al disolvente o sustituyente.

**Efecto hiperocrómico:** Aumento de la intensidad de absorción.

**Efecto Hipoocrómico:** Disminución de la intensidad de absorción.

El benceno manifiesta tres bandas de absorción en la región del ultravioleta: 184, 204 y 256 nm; éstas bandas se originan de las transiciones  $\pi \rightarrow \pi^*$ . La banda de 180 nm resulta de una transición permitida, mientras que las bandas de 204 (banda E) y 256 nm (banda B) son débiles y resultan de transiciones prohibidas en la molécula. La banda B en el benceno y muchos de sus homólogos se caracteriza por la estructura fina notable, esto es particularmente cierto en espectros determinados en fase vapor o en disolventes no polares; en disolventes polares, las interacciones entre el soluto y el disolvente tiende a reducir esta estructura fina.

La sustitución de grupos alquilo en el anillo de benceno produce un desplazamiento batocrómico de la banda B, en las bandas E el efecto no se define con precisión. El desplazamiento batocrómico que se observa, se atribuye a la hiperconjugación donde los electrones  $\sigma$  de un enlace C-H participan en resonancia con el anillo.





La sustitución en el anillo de benceno por grupos auxocrómicos, produce un desplazamiento batocrómico de las bandas E y B, así como la intensificación frecuente de la banda B y la pérdida de su estructura fina. Este efecto también se observa en la conversión de un fenol a su anión correspondiente, debido a los electrones adicionales que se encuentran disponibles para la interacción con los electrones  $\pi$  del anillo. Cuando la anilina se convierte en el catión anilinio, el par de electrones libres de la anilina ya no se encuentran disponibles para la interacción con el anillo, por lo que resulta un espectro casi idéntico al del benceno (efecto hipsocrómico).

Compuesto	Banda E <sub>2</sub>		Banda B		Disolvente
	$\lambda_{\max}$ (nm)	Intensidad <sub>max</sub>	$\lambda_{\max}$ (nm)	Intensidad <sub>max</sub>	
Anilina	230	8600	280	1430	Agua
Anilinio	203	7500	254	160	Ácido acuoso

La confirmación de una estructura del tipo de la anilina, se logra por comparación de los espectros determinados en solución neutra y ácida (pH = 1); ya que ambos espectros deberán coincidir en un punto denominado isobéptico por el cual pasarán los espectros de todas las disoluciones a diferentes concentraciones de éstas especies sin la presencia de otras especies que absorban a la misma longitud de onda.

La interacción entre los pares de electrones libres de un heteroátomo unido al benceno y los electrones  $\pi$  del anillo, es de suma efectividad cuando el orbital p de los electrones libres es paralelo a los orbitales  $\pi$  del anillo. Siendo así, que en general, la sustitución en posición *orto* de moléculas como la N,N-dimetilanilina causa un desplazamiento hipsocrómico en la banda E. El acoplamiento directo de un cromóforo al benceno produce un desplazamiento batocrómico intenso de la banda B y la aparición de una banda K en la región de 200 a 250 nm. Cuando grupos auxocrómicos aparecen en el mismo anillo que el cromóforo, ambos grupos influyen en la absorción, sin embargo, este efecto es más notable cuando un grupo donador de electrones se encuentra en posición *para*. El efecto de los sustituyentes en la banda B de la piridina se ilustra a continuación con los siguientes datos:







Derivado	$\lambda_{\max}$ (nm) pH>7	Intensidad $_{\max}$
Piridina	257	2750
2-CH <sub>3</sub>	262	3560
2-F	257	3350
2-Cl	263	3650
2-OH	230	10000

El desplazamiento batocrómico y el aumento de la intensidad de la banda K están relacionados con la contribución de las formas canónicas polares de resonancia. A su vez, la energía de resonancia es máxima cuando los anillos son coplanares y esencialmente nula cuando los anillos se encuentran perpendiculares entre sí.

Con respecto a los compuestos heteroaromáticos tenemos que el espectro de la piridina es similar al del benceno; la banda B, es algo más intensa y tiene una estructura fina menos diferenciada que la del benceno ya que esta transición es permisible para la piridina, pero prohibida para la molécula simétrica del benceno.

Un aumento en la polaridad del disolvente tiene poco o ningún efecto en la posición o intensidad de la banda B del benceno, pero produce un efecto notable hiperocrómico en la banda B de la piridina y sus homólogos. Este efecto indudablemente resulta de la formación de puentes de hidrógeno con el par de electrones libres del nitrógeno; el caso extremo se observa con la sal de piridinio. Para ejemplificar este efecto, a continuación se muestran datos de la 2-metilpiridina en diversos disolventes.

Disolvente	$\lambda_{\max}$ (nm)	Intensidad $_{\max}$
Hexano	260	2000
Etanol	260	4000
Agua	260	4000
Etanol-HCl (1:1)	262	5200

Los espectros electrónicos de absorción de los compuestos heteroaromáticos, están relacionados con sus análogos isocíclicos. A continuación se muestran datos que complementan la información:





Compuesto	Banda E <sub>1</sub>		Banda E <sub>2</sub>		Banda B	
	$\lambda_{\max}$ (nm)	Intensidad <sub>max</sub>	$\lambda_{\max}$ (nm)	Intensidad <sub>max</sub>	$\lambda_{\max}$ (nm)	Intensidad <sub>max</sub>
Benceno	184	60000	204	7900	256	200
Naftaleno	221	100000	286	9300	312	280
Quinolina	228	40000	270	3162	315	2500
Isoquinolina	218	63000	265	4170	313	1800

De acuerdo con lo anterior, proponemos que el comportamiento del etoxiquin debe ser similar al de una quinolina por lo que va a presentar máximos de absorción cercanos a 228, 270 y 315 nm en medio neutro. Tomando en cuenta los sustituyentes metilo, se espera un desplazamiento de +15 nm; la presencia del grupo metoxilo en el etoxiquin no provoca un desplazamiento batocrómico sobre los máximos de absorción, debido a que este sustituyente no esta coplanar con los anillos aromáticos, por lo que no produce efecto alguno sobre la resonancia de la molécula. En medio ácido, se espera un efecto hipsocrómico (aproximadamente de 30 nm) debido a que el par de electrones libre del nitrógeno ya no esta disponible, por lo que el espectro se parecerá más al de un naftaleno sustituido.

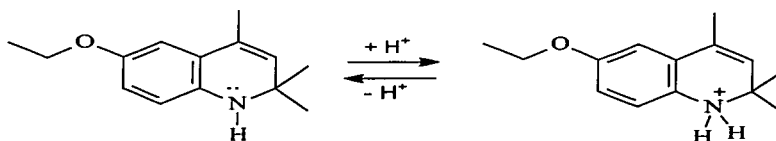


Figura A3.1 Equilibrio ácido-base del etoxiquin

De acuerdo con lo sugerido con respecto al etoxiquin, en el caso del producto de degradación encontrado en las muestras en estudio, etoxiquinolina, se propone que también va a presentar un comportamiento similar al de una quinolina. Tomando en cuenta los sustituyentes metilo se espera un desplazamiento de los máximos de absorción de +10 nm y de +30 nm por la aromaticidad extra de la molécula en medio neutro. En medio ácido, se espera también un efecto hipsocrómico debido a la falta de disponibilidad del par electrónico del nitrógeno, por lo que el espectro se parecerá más al de un naftaleno sustituido.



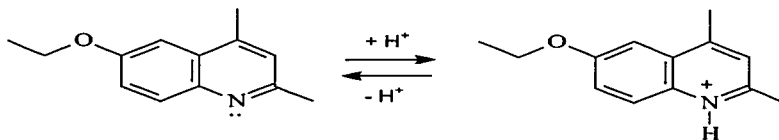


Figura A3.2 Equilibrio ácido-base de etoxiquinolina

Para la confirmación de lo anterior, se obtuvo el espectro de absorción del estándar de etoxiquin en medio ácido con un disolvente polar ( $H_2O$ ) y en medio neutro con un disolvente no polar (isooctano), que se muestra a continuación; en el caso de la etoxiquinolina no se obtuvieron los espectros de absorción debido a que no se tenían disponibles estándares.

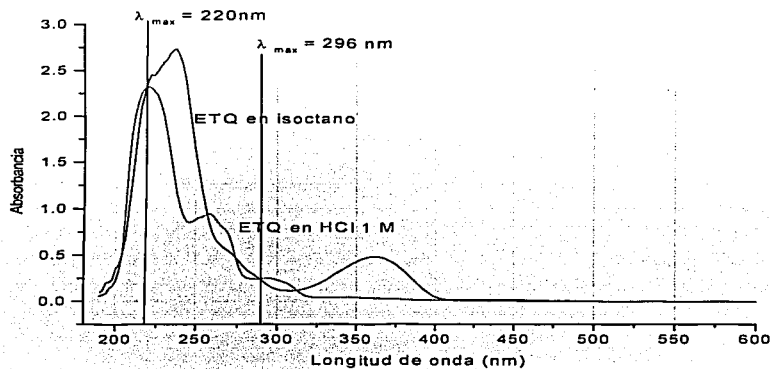


Figura A3.3 Espectro de Ultravioleta-visible del etoxiquin en solución acuosa ácida en comparación con etoxiquin en isooctano

