

00577

2
2ij



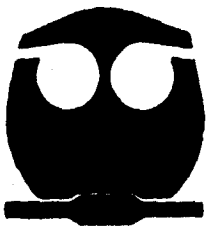
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

DERIVACION *IN SITU* Y EXTRACCION CON CO,
SUPERCRITICO DE CATECOLAMINAS Y COMPUESTOS
RELACIONADOS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS QUIMICAS
(QUIMICA ANALITICA)
P R E S E N T A
Q.F.B. NURIA ESTURAU ESCOFET



MEXICO, D. F.

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

JURADO ASIGNADO

Presidente: Dr. Eduardo Bárzana García
Primer Vocal: Dra. Luz Elena Vera Ávila
Secretario: Dra. Araceli Peña Álvarez
Primer Suplente: M. en C. Francisco Rojo Callejas
Segundo Suplente: Dra. Evangelina Camacho Frías

Lugares donde se desarrolló el tema:

Laboratorio de Cromatografía de Gases del Departamento de Química Analítica
y Laboratorio 314 del Departamento de Alimentos y Biotecnología,
Facultad de Química, UNAM.

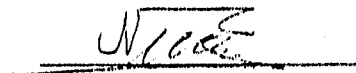
Asesor del Tema :

M. en C. Santiago Capella Vizeafno



Sustentante:

Q.F.B. Nuria Esturau Escofet



A mis padres

A mi hermano

Mi sincero agradecimiento

A mi asesor, Santiago Capella
por todo lo que me enseñó y por su amistad,

A Carmen Labastida y Araceli Peña
por sus valiosos consejos y apoyo,

A Eduardo Bárzana y Sandra Pérez
por la ayuda y observaciones brindadas en el Lab 314,

A todos mis profesores
por lo que aprendí de cada uno de ellos.

ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de etilo
ATFA	Anhídrido trifluoro acético
CG-EM	Cromatografía de Gases - Espectroscopia de Masas
CLAE	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia
C14	Tetradecano
DA	Dopamina
DA-TFA	Dopamina trifluoroacetilada
DOMA	Ácido dihidroximandélico
DOPA	Dihidroxifenilalanina
DOPAC	Ácido dihidroxifenilacético
DOPEG	Dihidroxifenil glicol
DOPET	Dihidroxifenil etanol
Dc	Densidad crítica
DEFS	Derivación y Extracción con Fluidos Supereríticos
E	Epinefrina o adrenalina
E-TFA	Epinefrina trifluoroacetilada
EFS	Extracción con Fluidos Supereríticos
FS	Fluido Supererítico
HMDS/TMCS	Hexametildisilazano/trimetilclorosilano
HVA	Ácido homovalínico
HVA-TFA	Ácido homovalínico trifluoroacetilado
MHPG	3-metoxi-4-hidroxi feniletilen glicol
MN	Metanefrina
MN-TFA	Metanefrina trifluoroacetilada
3MT	3-Metoxitiramina
NE-TFA	Norepinefrina trifluoroacetilada
NMN	Normetanefrina
NMN-TFA	Normetanefrina trifluoroacetilada
PC	Punto crítico
Pe	Presión crítica
PT	Punto triple
Tc	Temperatura crítica
VMA	Ácido vanililmandélico

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. GENERALIDADES	4
2.1. Extracción con Fluidos Supercríticos (EFS).	4
2.1.1. Fluidos supercríticos (FS).	4
2.1.2. Propiedades fisicoquímicas en la región supercrítica.	6
2.1.3. Extracción con FS (EFS).	8
2.1.4. Extracción con CO ₂ supercrítico.	8
2.1.5. Derivación y extracción con CO ₂ supercrítico.	9
2.2. Catecolaminas y compuestos relacionados.	10
3. ANTECEDENTES	13
4. DESARROLLO EXPERIMENTAL	15
5. METODOLOGÍA	16
5.1. Estudio <i>in vitro</i> de catecolaminas y compuestos relacionados.	16
5.1.1. Formación de los derivados.	16
5.1.2. Análisis de los derivados por CG-EM.	16
5.1.3. Adsorción de los analitos en el Chromosob WHP.	16
5.1.4. Método de calibración.	17
5.1.5. Estabilidad de las soluciones para calibración.	17
5.2. Derivación y extracción con CO ₂ supercrítico (DEFS).	17
5.2.1. Parámetros de operación constantes.	18
5.2.2. EFS de catecolaminas y compuestos relacionados sin derivar.	19
5.2.3. Estabilidad de las soluciones obtenidas con DEFS.	19
5.2.4. DEFS de las muestras para calibración. Influencia de la temperatura, la densidad, el tiempo de extracción estática y el cosolvente.	19

5.3. DEFS de cáscara de plátano y de glándula suprarrenal.	20
5.3.1. Preparación de las muestras.	20
5.3.2. EFS y DEFS.	21
5.3.3. Análisis de las muestras obtenidas con EFS.	21
5.3.4. Análisis de las muestras obtenidas con DEFS.	21
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
6.1. Estudio <i>in vitro</i> de catecolaminas y compuestos relacionados.	22
6.1.1. Formación y análisis de los derivados.	22
6.1.2. CG-EM de las soluciones para calibración.	28
6.1.3. Repetibilidad, reproducibilidad y estabilidad de las soluciones para calibración.	29
6.2. Derivación y extracción con CO ₂ supercrítico.	30
6.2.1. Parámetros de operación constantes.	30
6.2.2. EFS de catecolaminas y compuestos relacionados sin derivar.	31
6.2.3. Estabilidad de las soluciones obtenidas con DEFS.	32
6.2.4. DEFS de las muestras para calibración. Influencia de la temperatura, la densidad, el tiempo de extracción estática y el cosolvente.	33
6.3. DEFS de cáscara de plátano y de glándula suprarrenal.	36
6.3.1. Cáscara de plátano.	36
6.3.2. Glándula suprarrenal.	38
7.- CONCLUSIONES	41
REFERENCIAS	43

1.- INTRODUCCIÓN

La Extracción con Fluidos Supercríticos (EFS) es una técnica preparativa que actualmente se utiliza a escala analítica e industrial como una alternativa eficiente y rápida a la extracción con disolventes¹⁻⁴. El CO₂ supercrítico es el Fluido Supercrítico (FS) más empleado; sus principales cualidades son que tiene condiciones críticas moderadas, se separa fácilmente del soluto, no es tóxico, no causa problemas ambientales, no es inflamable y es más barato que otros fluidos en estado supercrítico.

La extracción con CO₂ supercrítico se usa exitosamente para la extracción de compuestos orgánicos relativamente no polares de una gran variedad de matrices, como la extracción de pesticidas de frutas y verduras⁴, sabores y fragancias de productos naturales⁵, pesticidas de suelos⁶ y compuestos sintéticos y naturales de plantas acuáticas^{7,8}. Para la extracción de compuestos más polares, iónicos y de alto peso molecular que no son solubles en el CO₂ supercrítico se ha recurrido a:

- a) Utilizar un fluido más polar en lugar de CO₂.
- b) Adicionar modificadores polares (disolventes orgánicos en pequeña proporción).
- c) Realizar la derivación química *in situ* en condiciones supercríticas.

Los fluidos más polares que el CO₂ como el óxido nitroso⁹⁻¹², el clorodifluorometano^{12,13}, el trifluorometano¹⁴ o el agua¹⁵, exhiben propiedades solubilizantes muy útiles pero su aplicación en análisis de rutina no es aceptada o está muy limitada por su toxicidad y/o su reactividad y/o las extremas condiciones de presión y temperatura para alcanzar el estado supercrítico.

Cuando se adicionan modificadores polares al CO₂ supercrítico, como metanol, etanol o acetona entre otros, se obtiene un fluido supercrítico binario que aumenta la solubilidad de algunos compuestos y desactiva ciertos sitios de adsorción en la matriz, lo que incrementa el intervalo de polaridad de los analitos extraíbles. La principal limitante en

este procedimiento es que los puntos críticos de la mezcla varían según la concentración de modificador que se adicione^{3,16-18}.

La derivación química *in situ* en condiciones supercríticas que recibe el nombre de Derivación y Extracción con Fluidos Supercríticos (DEFS) es el proceso más nuevo para la extracción de analitos polares, se empezó a utilizar en 1991 por Hill *et. al*¹⁹. Consiste en derivar *in situ* los grupos funcionales de los analitos y/o de la matriz para eliminar o reducir las interacciones matriz-analitos. Este procedimiento tiene la ventaja sobre la adición de modificadores polares de que es irreversible, por que los analitos salen de la matriz sin posibilidad de reabsorberse¹⁹⁻²⁹.

Las catecolaminas son neurotransmisores de gran importancia en el sistema nervioso central y periférico cuyo análisis en orina, plasma, fluido lumbar cerebroespinal o tejidos biológicos puede ayudar en la investigación, el diagnóstico y el tratamiento de varias enfermedades neurológicas y psiquiátricas, como los feocromocitomas (tumores productores de catecolaminas), la hipertensión, la enfermedad de Parkinson, las anomalías neuroquímicas que ocurren durante la manía, la depresión y la esquizofrenia. Por esto se han desarrollado procedimientos para determinar la concentración de las catecolaminas y de sus metabolitos que van desde métodos radioenzimáticos de alta sensibilidad hasta Cromatografía de Gases acoplada a Espectroscopia de Masas (CG-EM) que da los resultados más confiables.

Dentro de los métodos cromatográficos las catecolaminas y sus metabolitos se pueden analizar por CG con detector de ionización de llama³¹, CG-EM³²⁻³⁶ o por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) con detección electroquímica³⁶⁻⁴⁰, o fluorométrica⁴¹⁻⁴⁴. Por cualquiera de estos métodos, previo a su análisis, se requiere de pasos de purificación y concentración como son la extracción líquido-líquido con disolventes orgánicos^{34,35,41} o la adsorción con resinas de intercambio iónico^{37,42,44}, en alúmina^{32,33,36,43} o en geles de ácido bórico³⁸⁻⁴⁰. Todos estos pasos de tratamiento de muestra son demasiado elaborados, introducen errores y consumen tiempo.

Los objetivos de este trabajo consisten en:

- 1) Estudiar y optimizar la derivación y extracción con CO₂ supercrítico de catecolaminas, su precursor y sus metabolitos para analizarlos directamente por CG-EM y
- 2) Mostrar su aplicación como una alternativa sencilla y que consuma poco tiempo para la extracción de dichos compuestos de matrices reales.

La existencia de un punto crítico en la transición de fase gas-líquido sugiere que no hay diferencias fundamentales entre los estados líquido y gaseoso; de hecho es posible pasar del estado líquido al gaseoso alrededor del punto crítico sin que el fluido sufra ninguna discontinuidad. Esto se debe a que entre el gas y el líquido sólo existen diferencias cuantitativas entre sus propiedades (en la densidad y en el ambiente molecular promedio) ya que en ambas fases la estructura local tiene simetría esférica.

En la Figura 1 se observa que al aumentar la temperatura, la presión a la que hay coexistencia entre el líquido y el gas también aumenta. Con el aumento de la presión de vapor la diferencia en densidades de la fase líquida y gaseosa decrece hasta que las densidades son iguales. A temperaturas o presiones más altas el líquido y el gas son indistinguibles, es decir constituyen una sola fase. Esta zona de presión y temperatura por encima de T_c y P_c es la región supercrítica.

Un fluido supercrítico (FS) se define como un fluido que se ha calentado por encima de su T_c y simultáneamente se ha comprimido a una presión mayor que su P_c . Es un estado de la materia en el que ésta es compresible, llena y toma la forma de su contenedor, es decir que se comporta como un gas. No obstante, tiene la densidad de un líquido. Los valores de las propiedades críticas para algunos disolventes se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Propiedades críticas para algunos disolventes.

Disolvente	T_c (°C)	P_c (bar)	D_c (g/mL)
Metanol	239	78.9	0.27
Hexano	234.2	28.9	0.23
Trifluorometano	26	46.9	0.52
Diclorodifluorometano	111.7	109.8	0.558
Agua	374.2	214.8	0.33
Óxido nitroso	36.5	70.6	0.45
Amoníaco	132.5	109.8	0.23
CO ₂	31.1	72	0.47

2.1.2. Propiedades fisicoquímicas en la región supercrítica.

Las buenas propiedades disolventes de un FS se deben a que la densidad de los FS esta próxima a la de los líquidos (Tabla 2) y por tanto las interacciones entre las moléculas del fluido y las del soluto son semejantes a las que existen en las soluciones líquidas. El valor de la densidad depende de la presión y temperatura a la que se encuentra el fluido; al aumentar la temperatura a presión constante la densidad disminuye, mientras que al incrementar la presión a temperatura constante la densidad aumenta. En la Figura 2 se representa el diagrama de densidad en función de presión para varias isotermas, todas las variables son reducidas (cociente del valor real entre el valor del punto crítico). Del diagrama hay que destacar que los cambios de presión y temperatura cerca del punto crítico provocan cambios de densidad mucho mayores que los cambios lejos del punto crítico.

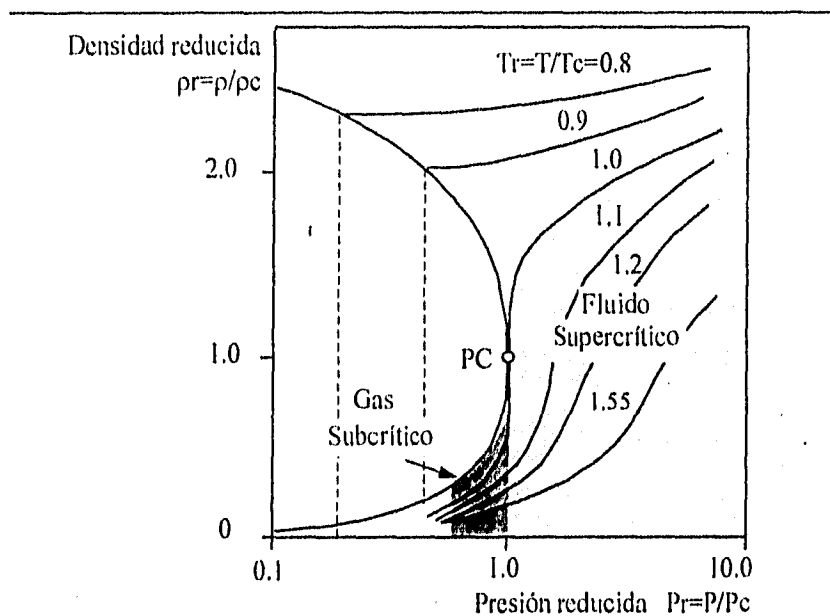


Figura 2. Diagrama densidad reducida / presión reducida para diversas isotermas.

La fuerza disolvente de cualquier fluido está directamente relacionada con la "polaridad" que es la capacidad de interacción entre el solvente y el soluto por medio de fuerzas de dispersión, dipolo, enlaces de hidrógeno e interacciones dieléctricas. La fuerza

disolvente puede ser descrita por el parámetro de solubilidad de Hildebrand (δ). Para que un soluto sea solubilizado el parámetro de solubilidad del soluto y del disolvente deben ser similares. En los fluidos supercríticos Giddings expuso el parámetro de solubilidad como una función de la densidad:

$$\delta = 1.25 * P_c^{1/2} * \frac{P_{LS}}{P_{li}}$$

En esta ecuación se observa que al aumentar la densidad del FS δ aumenta, y por tanto la fuerza disolvente. Mientras más alto sea el valor de δ se pueden solubilizar compuestos más polares.

La viscosidad de un fluido supercrítico depende al igual que en los líquidos de la temperatura y a diferencia de los líquidos depende de la presión. Al aumentar la presión aumenta la viscosidad lo que lleva a una disminución de la difusividad de los solutos y de la rapidez de transporte de masa, aunque también aumenta la solubilidad (en la mayoría de los casos) como consecuencia de un aumento en la densidad. En comparación con los disolventes líquidos la difusividad de los solutos en los FS es un orden de magnitud más alta y la viscosidad de los FS un orden de magnitud más baja (Tabla 2), por lo que sus características hidrodinámicas y de transferencia de masa son más favorables que las de los líquidos.

Los FS al igual que los gases no tienen tensión superficial (Tabla 2) lo que les permite una alta penetrabilidad a través de los sólidos porosos y los lechos empacados.

Tabla 2. Comparación de valores de los parámetros de los gases y de los líquidos con los del CO₂ en estado supercrítico.

		Densidad (g/cm ³)	Viscosidad (g/cm.s)	Coefficiente de difusión (cm ² /s)	Tensión superficial (dinas)
Gases		(0.1-2)10 ⁻³	(1-3)10 ⁻⁴	0.1-0.4	0
CO ₂ supercrítico	Tc, Pc	0.47	3 x 10 ⁻⁴	7 x 10 ⁻⁴	0
	Tc, 6Pc	1.0	1 x 10 ⁻³	2 x 10 ⁻⁴	0
Líquidos		0.6-1.6	(0.2-3)10 ⁻²	(0.2-2)10 ⁻⁵	finito

2.1.3. Extracción con FS.

Las principales ventajas de la EFS sobre los disolventes líquidos son:

- Como la transferencia de masa es la que limita la rapidez de una extracción, la EFS es más rápida.
- La mayor penetrabilidad de los FS favorece la eficiencia de extracción en muestras sólidas.
- La EFS reduce el uso de disolventes orgánicos.
- Si el FS es gas en condiciones ambientales los solutos pueden ser separados tan sólo reduciendo la presión, mientras que en la extracción líquida se requiere de la evaporación para remover el disolvente extractante.
- El poder modificar la fuerza disolvente de los FS permite que con un mismo fluido se obtengan selectividades diferentes.

2.1.4. Extracción con CO₂ supercrítico.

El CO₂ es el FS más empleado, tiene una Pc moderada (72.85 atm) y su baja Tc (31° C) es ideal para la extracción de muchos compuestos termolábiles, como en condiciones ambientales es un gas es fácilmente separable del soluto, no es tóxico, no causa problemas ambientales, no es inflamable y es barato. Sin embargo, no es adecuado para disolver compuestos polares ya que el δ es bajo. Se puede comparar, en el intervalo de trabajo normal (densidad de 0.6 a 0.9 g/mL), con disolventes de $\delta \sim 7$ como son los hidrocarburos hasta disolventes de $\delta \sim 9$ como tolueno, benceno o cloroformo. Para la extracción de compuestos polares se pueden utilizar otros FS con δ más altas como son el N₂O ($\delta \sim 10.3$), NO₂ ($\delta \sim 12.5$), NH₃ ($\delta \sim 13.3$) y MeOH ($\delta \sim 14.5$). Sin embargo para la elección de un fluido no solo se toma en consideración sus propiedades disolventes, sino también se consideran otras propiedades prácticas. En la Tabla 3 se muestran las principales limitantes para los fluidos polares.

Tabla 3. *Propiedades favorables (+) y desfavorables (-) para algunos fluidos.*

Propiedades	MeOH	Hidro-carburos	Clorofluoro-carbonos	N ₂ O	H ₂ O	NH ₃	CO ₂
Toxicidad	-	+	+	-	+	-	+
Inflamabilidad y explosividad	-	-	+	-	+	+	+
Bajo costo	-	+	+	+	+	-	+
Reactividad	-	+	+	-	-	-	+
Tc y Pc fácil de alcanzar	-	+	+	+	-	-	+
Agresivo al medio ambiente	-	-	-	-	+	-	+
Gas a T y P ambiente	-	+	+	+	-	+	+
Polaridad	+	-	+	+	+	+	-

Para poder extraer compuestos polares utilizando CO₂ se ha recurrido a:

1. La adición al CO₂ de modificadores polares para obtener un fluido supercrítico binario de mayor fuerza disolvente^{3,16-18}.
2. La adición de agentes derivantes para derivar *in situ* los grupos funcionales de los analitos y/o de la matriz¹⁹⁻²⁹. Al derivar los grupos funcionales de los analitos se obtienen compuestos menos polares y por tanto más solubles en el CO₂. Al derivar los grupos funcionales de la matriz se desplaza a los analitos hacia el fluido.

2.1.5. Derivación y extracción con CO₂ supercrítico.

La DEFS se realiza en dos pasos. El primer paso se lleva a cabo de modo estático donde se adiciona el reactivo derivante a la muestra en una celda cerrada que se mantiene en contacto con el fluido termostataado y presurizado, sin que exista flujo a través de la misma, durante un tiempo denominado "tiempo de derivación". El segundo paso ocurre de modo dinámico donde se aplica un flujo constante de CO₂ a través de la celda. La reacción de derivación de los grupos funcionales de los analitos y/o de la matriz se produce en la etapa estática y la extracción de los analitos en la etapa dinámica.

2.2. Catecolaminas y compuestos relacionados^{48,49}.

En los animales, las catecolaminas son moléculas con la función de mensajeros intercelulares, participan en la transferencia de información simpática actuando como neurotransmisores y en la transferencia de información neurohormonal actuando como moduladores neurohormonales o como hormonas. Ciertas catecolaminas también se encuentran en algunas plantas, donde entre otras aminas y fenoles están involucradas en los procesos enzimáticos de oscurecimiento y en la producción del color.

La adrenalina, también llamada epinefrina (E) es una de las drogas más valiosas empleadas en medicina ya que prepara al sistema cardiovascular para una acción repentina aumentando el ritmo cardíaco y la presión de la sangre, estimula la degradación de glucógeno hepático liberando glucosa a la sangre (combustible para el trabajo muscular) y promueve la degradación del glucógeno muscular hasta lactato con lo que se estimula la formación glucolítica de ATP.

Las catecolaminas se sintetizan en la médula adrenal que es la porción interna de las glándulas adrenales, también llamadas glándulas suprarrenales, y en las neuronas simpáticas postsinápticas a partir del aminoácido básico Tirosina que es aportado por la dieta. La hidroxilación de la Tirosina forma dihidroxifenilalanina (DOPA) que luego se transforma en Dopamina (DA), Noradrenalina también llamada Norepinefrina (NE) y finalmente E (Fig 3).

Las catecolaminas se almacenan en gránulos específicos de la médula adrenal y en las neuronas simpáticas hasta que mediante estímulos físicos, químicos y neuronales como son el calor, el frío, la tensión emocional, la hipoglucemia, la hemorragia, la asfixia y numerosos fármacos son liberadas a la circulación. La catecolamina predominante en la médula adrenal es la E y constituye del 70 al 90 % del total (de 0.5 a 1.0 mg /g de tejido). Normalmente, el nivel de E en la sangre es de 0.06 µg/L, pero el estímulo sensible provoca

que la concentración de E en sangre aumente casi un millar de veces en unos segundos o minutos.

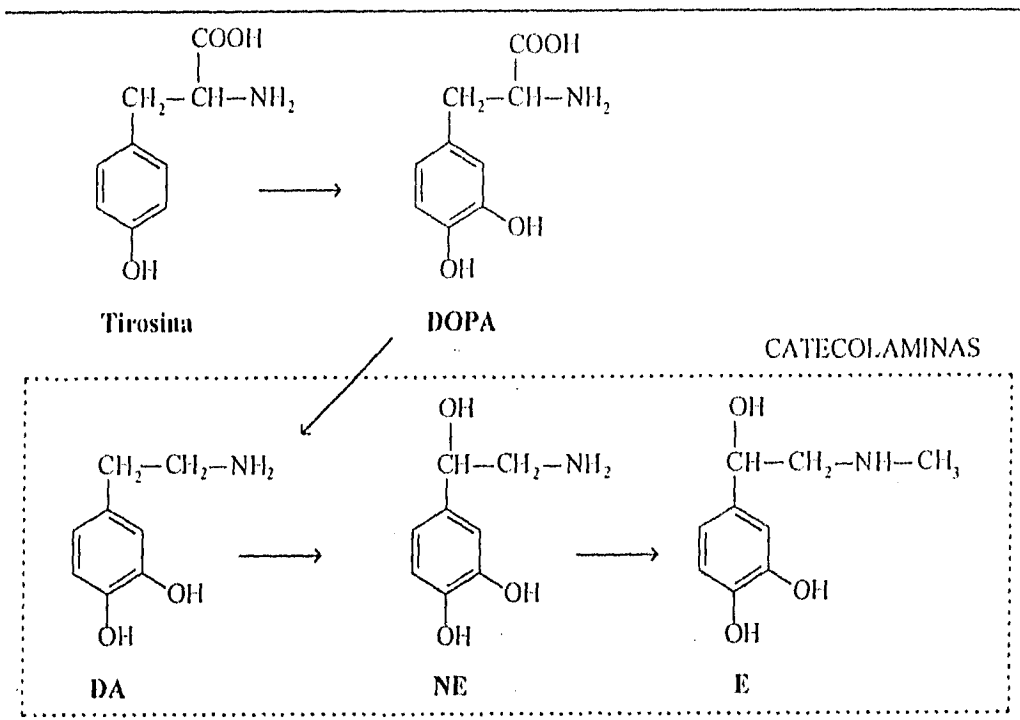


Figura 3. Biosíntesis de las catecolaminas

Por la orina se excretan pequeñas cantidades de catecolaminas sin modificar, pero su porción mayor es convertida en metabolitos inactivos (o-metilados y desaminados) antes de su excreción. Los principales metabolitos son Metanefrina (MN), Normetanefrina (NMN), ácido dihidroximandélico (DOMA), dihidroxifenil glicol (DOPEG) ácido vanililmandélico (VMA), 3-metoxi-4-hidroxi feniletlen glicol (MHPG), 3-Metoxitiramina (3MT), ácido dihidroxifenilacético (DOPAC), dihidroxifenil etanol (DOPET) y ácido homovalínico (HVA) algunos de los cuales se encuentran esquematizados en la Figura 4.

Además de la determinación de catecolaminas en orina, plasma, fluido lumbar cerebrospinal o tejidos biológicos para la investigación, el diagnóstico y el tratamiento de varias enfermedades neurológicas y psiquiátricas, algunas catecolaminas se determinan en alimentos y bebidas como frutas, vegetales, jugos y cerveza para buscar su relación entre el

consumo de estos productos y el cáncer, la susceptibilidad al estrés o a reacciones de alergia. Su determinación también sirve como indicador de la calidad de la carne y de otros productos.

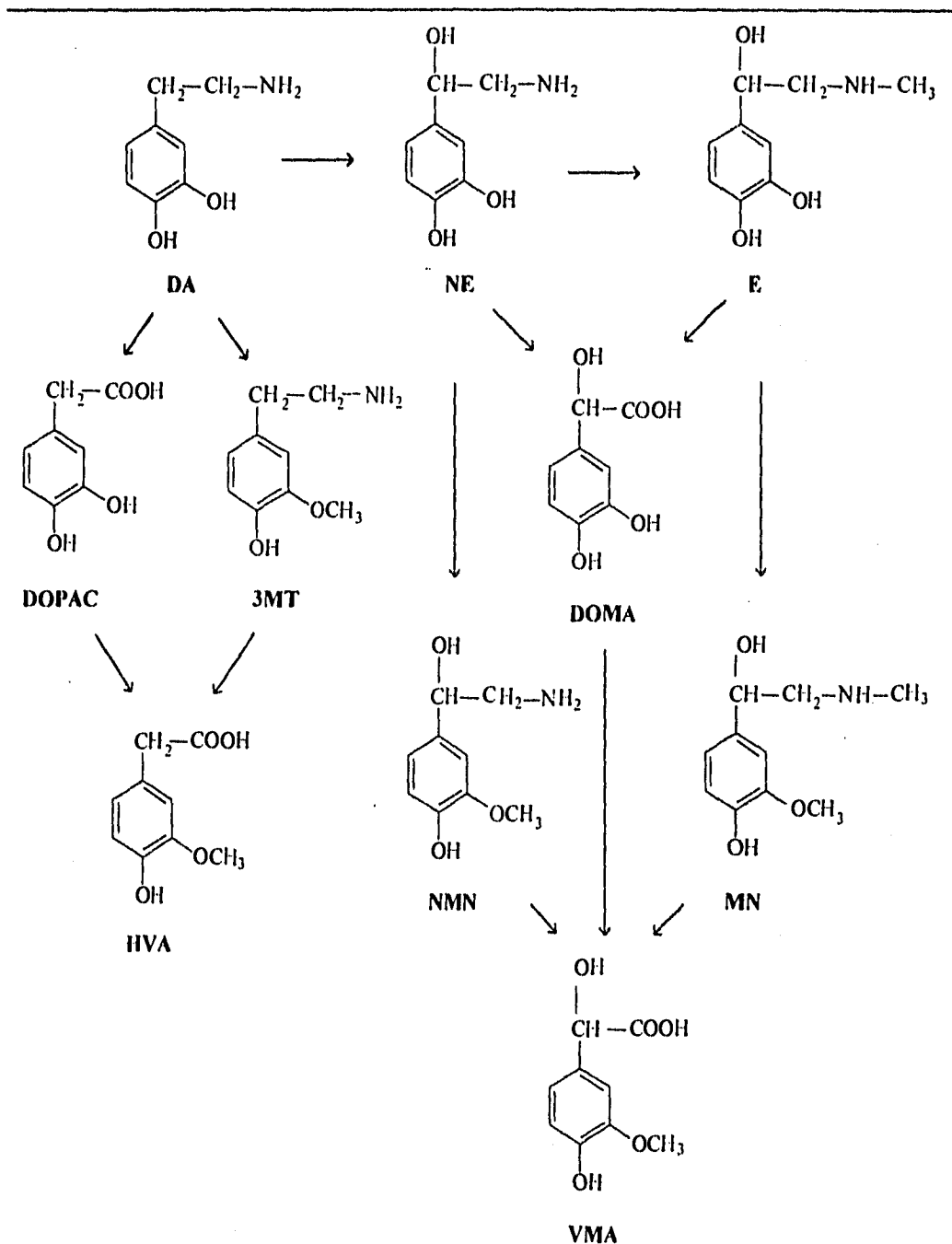


Figura 4. Metabolismo de las catecolaminas.

3.- ANTECEDENTES

La DEFS fué desarrollada muy recientemente por Hill *et. al.* (1991) ¹⁹ quienes después de realizar una extracción exhaustiva con CO₂ de muestras de granos de café tostado, té Japonés tostado y sedimento marino, adicionaron un reactivo sililante (mezela hexametildisilazano/trimetilclorosilano (HMDS/TMCS)). Mostraron la extracción de analitos con grupos funcionales sililados como son el ácido oxálico, ácidos dicarboxílicos y alcoholes. Además observaron que con la adición del reactivo sililante se extrajeron analitos como la cafeína y el nonacosano que no forman derivados con el reactivo. En este caso, la extracción de dichos analitos se explica por la derivación de los centros de adsorción de la matriz.

Posteriormente, varios investigadores extrajeron analitos polares de diferentes matrices empleado en las celdas de EFS los reactivos tradicionales de derivación.

A finales de 1991 y en 1992 Hawthorne *et al* ^{20,21}, utilizando como reactivo metilante trimetilfenilamonio en metanol o trifloruro de boro en metanol realizaron la extracción de: herbicidas de suelos y sedimentos, alquilbencensulfonatos lineales de aguas de desecho, fosfolípidos bacterianos como metil ésteres de bacterias enteras y fenoles como metil éteres de aguas de desecho.

En 1992 Lee *et. al.* ²² extrajeron pentaclorofenol y compuestos relacionados de suelos y sedimentos formando acil derivados con trietil amina y anhídrido acético. En ese mismo año King *et. al.* ²³ extrajeron triglicéridos de semillas en forma de metil ésteres de ácidos grasos utilizando alúmina con metanol (catálisis sólida).

Los trabajos que se realizaron en 1993 sobre la DEFS son: Hillmann y Bachmann ²⁴ reportaron la extracción de ácidos fenocarboxílicos adsorbidos en discos C18 utilizando pentafluorobencilbromuro en acetona. López-Ávila *et. al.* ²⁵ realizaron la extracción como

metil ésteres de herbicidas de muestras de suelo, con diferentes agentes derivantes entre ellos el tetrabutil amonio/ioduro de metileno y el pentafluorobencilbromuro / trietilamina. Hills y Hill ²⁶ extrajeron hidrocarburos aromáticos policíclicos de polvo urbano y sedimento marino formando silil derivados con la mezcla HMDS/TMCS. Lee *et. al.* ²⁷ formaron y extrajeron acetil derivados de fenoles clorados en sedimentos utilizando trietil amina y anhídrido acético.

En 1994 Cal *et. al.* ²⁸ extrajeron butilestaño y fenilestaño en sedimentos formando hexil derivados con bromuro de hexilmagnesio. Croft *et. al.* ²⁹ metilaron y extrajeron ácidos orgánicos de soluciones acuosas con ioduro de metileno y sulfato de hidroxitetrahexilamonio.

Finalmente en 1996 Llompart *et. al.* ³⁰ optimizaron y validaron la extracción de fenoles de muestras de suelo formando derivados acetilados.

Esta metodología está en sus inicios pero los trabajos publicados hasta el momento ponen en evidencia su versatilidad.

4.- DESARROLLO EXPERIMENTAL

Para el análisis cromatográfico de las catecolaminas y de sus metabolitos se requiere de la formación de derivados que disminuyan el carácter polar de estos compuestos ^{32-34,36,50}. Los reactivos derivantes utilizados en la DEFS son generalmente los mismos que en la CG, por lo que la DEFS no sólo es el paso de extracción de los analitos, sino que también los prepara para su determinación cromatográfica. En el presente estudio se seleccionó un agente derivante que forma derivados estables con las catecolaminas y sus metabolitos en el CO₂ supercrítico.

En toda reacción de derivación el tiempo, la composición de reactivos y la temperatura son variables muy importantes a controlar para que la reacción de derivación sea cuantitativa. Además, la densidad de un fluido supercrítico y por tanto su poder disolvente depende ampliamente de la presión y temperatura a la que se encuentra el fluido. Todas estas variables se estudiaron con objeto de determinar los valores de los parámetros que maximizan la DEFS de catecolaminas y compuestos relacionados en una matriz artificial libre de interacciones.

También se estudiaron las condiciones en que las catecolaminas y sus metabolitos no se extraen con CO₂ supercrítico, para demostrar que estas condiciones se puede utilizar como paso de limpieza de compuestos no polares.

Una vez seleccionadas las mejores condiciones de trabajo se realizó la DEFS en muestras reales (cáscara de plátano y glándula suprarrenal) para descubrir especies interferentes coextraídas o para detectar interferencias matriz/soluto que pudieran retardar la extracción de los analitos, en cuyo caso se modificarían las condiciones de trabajo para eliminar dichos efectos de matriz.

5.- METODOLOGÍA

5.1. Estudio *in vitro* de catecolaminas y compuestos relacionados.

5.1.1. Formación de los derivados.

Se adicionaron 50 μ L de anhídrido trifluoro acético (ATFA) (Supelco, Bellefonte,PA,USA) y 150 μ L de acetato de etilo (AcOEt) (E. Merck, Darmstadt, Germany) a 0.1 mg de c/u de los siguientes compuestos: DOPA, DA, NE, E, NMN, MN, DOPAC, DOMA, MHPG, HVA y VMA (Sigma, St. Louis, MO, USA). Las mezclas se calentaron a 80°C por 30 min, se llevaron a sequedad bajo corriente de nitrógeno y se resuspendieron en 1 mL de AcOEt.

5.1.2. Análisis de los derivados por CG-EM.

Los análisis se realizaron inyectando 1 μ L a un cromatografo de gases Hewlett-Packard modelo 5890 acoplado a un detector de masas Hewlett-Packard modelo 5971 (Hewlett-Packard, Avondale, CA, USA). Se utilizó una columna capilar con fase estacionaria SAC-5 (30 m x 0.25mm D.I., 0.25 μ m) de Supelco (Bellefonte,PA,USA). La temperatura de la columna se programó a 20 °C/min, la temperatura inicial fue de 60°C durante 1 min y la final de 260°C durante 0.5 min. La temperatura del inyector fue de 250°C y la de la línea de transferencia 280°C. El tipo de inyección fue "splitless" durante 1 min. La identificación de los compuestos se realizó con monitoreo total de iones ("SCAN") en el intervalo m/z de 10 a 550 m/z.

5.1.3. Adsorción de los analitos en el Chromosorb WHP.

Se adicionaron 5.6 ml de agua templada (40°C) a una mezcla de 8 mg de c/u de los siguientes compuestos: DOPA, DA, NE, E, NMN y MN. La solución se agitó hasta disolver

completamente y se le adicionaron 22.4 ml de metanol (MeOH) (Mallinckrodt, Paris, K, USA). La solución resultante se mezcló con 8 g de Chromosorb WHP 80/100 (Johns Manville, Denver, CO, USA) y se secó por 3 hr a 100°C.

5.1.4. Método de calibración.

Se adicionaron 100 µL de ATFA y 300 µL de AcOEt a 110, 100, 80, 60, 40, 20 y 10 mg de Chromosorb/analitos. La mezcla se calentó a 80°C por 30 min, se llevó lentamente a sequedad bajo corriente de nitrógeno y se adicionó 1 mL de AcOEt. A esta solución final se añadieron 10 µL de AcOEt con 1% v/v de tetradecano (C14) (PolyScience Co., Illinois, USA) como estándar interno, se dejó sedimentar el Chromosorb y el sobrenadante se inyectó por triplicado. Todas las soluciones se guardaron a 4°C. Todos los días se prepararon nuevas soluciones para calibración que se inyectaron justo antes del análisis cromatográfico de las soluciones obtenidas con DEFS. Todas las muestras se cuantificaron con la curva de calibración de cada día. El factor de respuesta relativo se calculó con el promedio de las tres réplicas de inyección.

5.1.5. Estabilidad de las soluciones para calibración.

Para evaluar la estabilidad de los derivados se analizaron a diferentes tiempos (2, 4, 24, 48, y 58 hrs) soluciones para calibración almacenadas a 4°C y a temperatura ambiente.

5.2. Derivación y extracción con CO₂ supercrítico.

La DEFS se realizó en un equipo Hewlett-Packard modelo HP7680T (Hewlett-Packard, Avondale, CA, USA) con una celda de extracción estándar de 7 mL y una trampa sólida empacada con acero inoxidable. Para la extracción se utilizó dióxido de carbono (CO₂) grado SFC/SFE (Air Products, Allentown, PA, USA) y para enfriar la bomba y la trampa se utilizó CO₂ seco (Linde de México, México D.F., México).

5.2.1. Parámetros de operación constantes.

Las variables: flujo de CO₂, número de volúmenes de lavado de celda y volumen y flujo de disolvente en la elución se estudiaron en experimentos independientes. Para conocer el número de volúmenes de lavado requerido para extraer todos los compuestos de la celda de extracción se adicionaron 100 µL de ATFA a 100 mg de Chromosorb/analitos en la celda de extracción. La DEFS estática se realizó a 40°C y 0.4 g/mL durante 10 min y la DEFS dinámica a un flujo de CO₂ de 0.5 mL/min (medido como CO₂ líquido a la salida de la bomba) en tres pasos, donde cada paso corresponde a 2 volúmenes de lavado (12 min cada paso). En este mismo experimento, para determinar el volumen de disolvente necesario para eluir todos los compuestos de la trampa de acero inoxidable, al terminar cada paso los compuestos se eluyeron de la trampa de acero inoxidable con 3 ml de AcOEt (1ml en cada vial). Para corroborar estos resultados y conocer la influencia del flujo de CO₂, el experimento anterior se repitió con un flujo de CO₂ de 4 ml/min también en tres pasos, cada uno de 2 volúmenes de lavado (1.5 min cada paso). Se realizaron pruebas para estudiar el efecto del flujo del disolvente al eluir los compuestos derivados de la trampa a 2, 1 y 0.5 mL/min. En la Tabla 4 se encuentran los valores de éstos y otros parámetros que para el resto de los experimentos se mantuvieron constantes.

Tabla 4 Parámetros de operación constantes

Flujo de CO ₂ (mL/min)	4
Número de volúmenes de lavado	7
Temperatura de la boquilla (°C)	40
Temperatura de la Trampa (°C)	25
Flujo de elución de la Trampa (mL/min)	2
Volumen de elución (mL)	1

5.2.2. EFS de catecolaminas y compuestos relacionados sin derivar.

Para detectar la extracción de compuestos sin derivar se realizó la EFS de 100 mg de Chromosorb/analitos a: 0.40 g/mL (40°C, 87 bar y 80°C, 143 bar), 0.95 g/mL (40°C, 383 bar) y 0.80 g/mL (80°C, 365 bar) y se utilizó metanol para eluir los compuestos de la trampa. Para analizar estas soluciones se evaporó el metanol y se aplicó el mismo procedimiento de derivación y análisis que a las muestras para calibración. También para comprobar la no extracción de los compuestos se aplicó el mismo procedimiento de derivación y análisis al Chromosorb de la celda después de la extracción.

5.2.3. Estabilidad de las soluciones obtenidas con DEFS.

Para evaluar la estabilidad de los derivados almacenados a 4°C se analizaron a diferentes tiempos (0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 6 y 12 hrs) soluciones obtenidas con DEFS en AcOEt puro y en AcOEt con 10 µl ATFA.

5.2.4. DEFS de muestras para calibración. Influencia de la temperatura, la densidad, el tiempo de extracción estática y el cosolvente.

Los experimentos se realizaron adicionando 100 µL de ATFA (agente derivante) o 400 µL de ATFA/AcOEt 1:3 (v/v) (mezcla agente derivante/cosolvente) directamente a 100 mg de Chromosorb/analitos en la celda de extracción; inmediatamente la muestra y el reactivo fueron calentados y presurizados con CO₂. La derivación y extracción se llevó a cabo primero de modo estático y luego de modo dinámico. Los componentes derivados se eluyeron con AcOEt, se colectó el mililitro eluido después del volumen muerto (0.7ml) en un vial con 10 µL de ATFA y se guardó a 4°C por no más de 6 hrs. A cada vial se le adicionaron 10 µL de AcOEt con 1% v/v de C14. No se le dio ninguna otra preparación a la muestra antes del análisis cromatográfico.

Se elaboró un diseño experimental aleatorizado de dos niveles* para evaluar la influencia de la temperatura en la celda de extracción (A), la densidad del CO₂ (B), el tiempo de extracción estática (C) y el cosolvente (D) (Tabla 5).

Factor	Variable	Nivel	
		Bajo (-)	Alto (+)
A	Temperatura en la celda de extracción (°C)	40	100
B	Densidad de CO ₂ (g/cm ³)	0.4	0.7
C	Tiempo de extracción estática (min)	5	30
D	Cosolvente	-	300 µL AcOEt

Tabla 5. *Condiciones DEFS.*

Posteriormente se elaboró un diseño experimental aleatorizado con réplicas de tres factores (A, B y C) y los mismos niveles, para evaluar la influencia de la temperatura en la celda de extracción (A), la densidad del CO₂ (B) y el tiempo de extracción estática (C).

5.3. DEFS de cáscara de plátano y de glándula suprarrenal.

5.3.1. Preparación de las muestras.

Cáscara de plátano:

Se liofilizó una cáscara de plátano amarillo (plátano tabasco) obtenida comercialmente y se cortó en trozos de 1 a 2 mm de diámetro. Se tomaron 11.5 mg de materia seca (equivalente a 0.1 g materia húmeda) y se mezclaron con 150 mg de Chromosorb.

Glándula suprarrenal:

Se liofilizaron 2 glándulas adrenales (médula, cortex y un poco de grasa) de perro proporcionadas por la Facultad de Veterinaria de la UNAM y se cortaron en trozos de aproximadamente 1 mm de diámetro. Se tomaron muestras entre 50 y 200 mg de tejido seco (50% de humedad) y se mezclaron con aproximadamente 150 mg de Chromosorb.

*Nota: En éste primer diseño experimental no se adicionaron 10 µL de ATFA a cada vial.

5.3.2. EFS y DEFS.

La mezcla de Chromosorb/muestra se colocó en la celda de extracción y se realizaron dos EFS consecutivas [densidad de 0.7 g/mL (115 bar y 40°C), 5 min modo estático y 9.5 min modo dinámico (7 volúmenes de lavado)] para eliminar lípidos y otros compuestos no polares. Posteriormente se realizaron dos DEFS consecutivas para extraer los compuestos de interés [300 µL de ATFA antes de cada extracción, densidad de 0.7 g/mL (115 bar y 40°C), 30 min modo estático y 9.5 min modo dinámico (7 volúmenes de lavado)].

5.3.3. Análisis de las muestras obtenidas con EFS.

Las muestras obtenidas con EFS se analizaron por Cromatografía de Gases de Alta Temperatura en un equipo Hewlett Packard 5890 Serie II Plus equipado con detector de ionización de llama e inyector "on-column" (Hewlett-Packard, Avondale, CA, USA). Se utilizó una columna capilar con fase estacionaria SPB-50 (10 m x 0.25mm D.I., 0.25 µm) de Supelco (Bellefonte, PA, USA). Un flujo constante de He de 4.45 ml/min. La temperatura de la columna se programó a 20°C/min, la temperatura inicial fue de 60°C y la final fue de 350°C durante 15 min. La temperatura del detector de ionización de llama fue de 350°C. La temperatura del inyector se mantuvo 3°C por encima de la temperatura de la columna. La identificación de los triglicéridos se realizó comparando con estándares y se comprobó hidrolizando y formando los ésteres metílicos de ácidos grasos que se analizaron e identificaron por CG-EM con las mismas condiciones antes descritas (5.1.2.).

5.3.4. Análisis de las muestras obtenidas con DEFS.

Las muestras se analizaron por CG-EM con las condiciones ya establecidas (5.1.2.). En algunos casos el tiempo final se extendió entre 5 y 20 minutos para verificar que no existían compuestos más retenidos.

6.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Estudio *in vitro* de catecolaminas y compuestos relacionados.

6.1.1. Formación y análisis de los derivados.

Utilizando como catecolamina modelo la DA se descartó la utilización de bis trimetil trifluoro acetamida (BSTFA), y de anhídrido acético (AcO₂) como agentes derivantes porque el derivado formado era inestable o la reacción era incompleta y se seleccionó ATFA como agente derivante en la mezcla 1:3 con AcOEt. Para todos los compuestos que no poseen grupo carboxilo esta metodología dio excelente resultado, se obtuvo en cada caso un solo pico cromatográfico, estable y con el espectro de masas esperado. El cromatograma iónico de los derivados TFA de DA, E, NE, MN y NMN se muestra en la Figura 5. Los espectros de masas se muestran en las Figuras 6 a la 10. Las principales señales *m/z*, además de *m/z*= 69 correspondiente al ion CF₃⁺, característico de todos los derivados TFA, se encuentran en la Tabla 6. El esquema de fragmentación se muestra en la Figura 11.

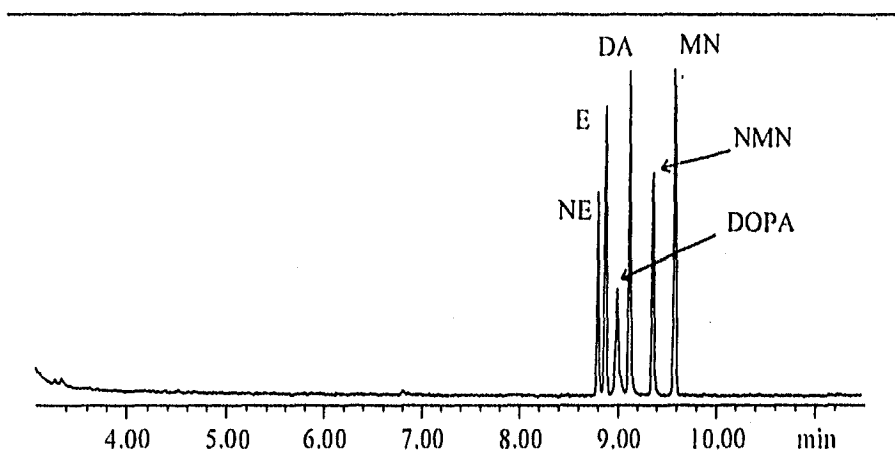


Figura 5. Cromatograma Iónico de los derivados TFA de DOPA DA, E, NE, MN y NMN. Columna SAC-5 (30m x 0.25mm D.I., 0.25 μ m). Programa de temperatura: 60°C durante 1 min incrementándose a 20 °C/min hasta 260°C durante 0.5 min. Inyector: 250°C. Línea de transferencia: 280°C. Inyección "splitless" durante 1 min. "SCAN" de 10-550 *m/z*.

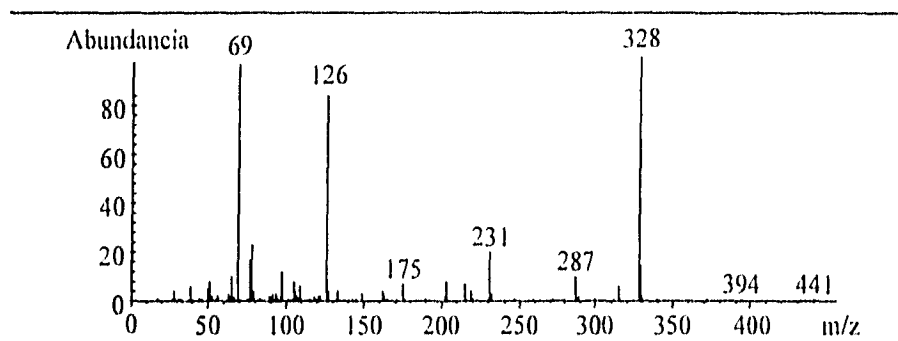


Figura 6. Espectro de masas de DA-TFA.

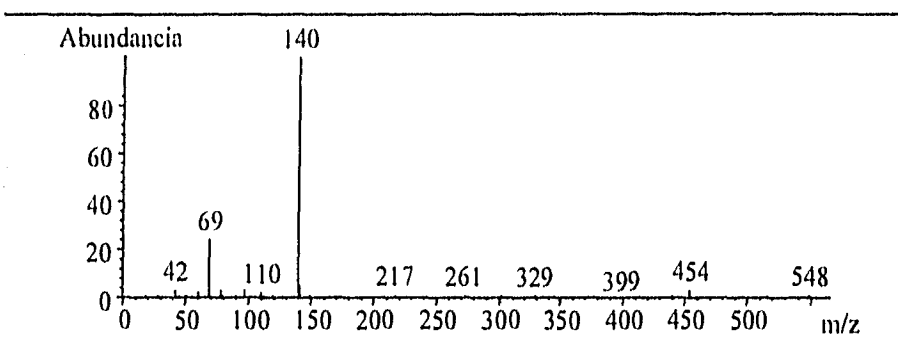


Figura 7. Espectro de masas de E-TFA.

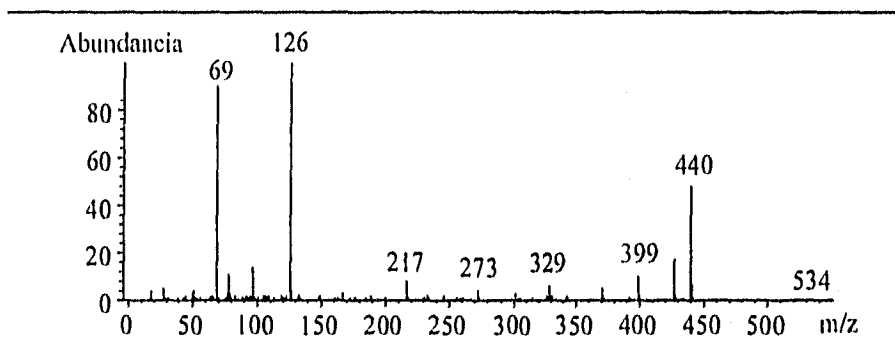


Figura 8. Espectro de masas de NE-TFA.

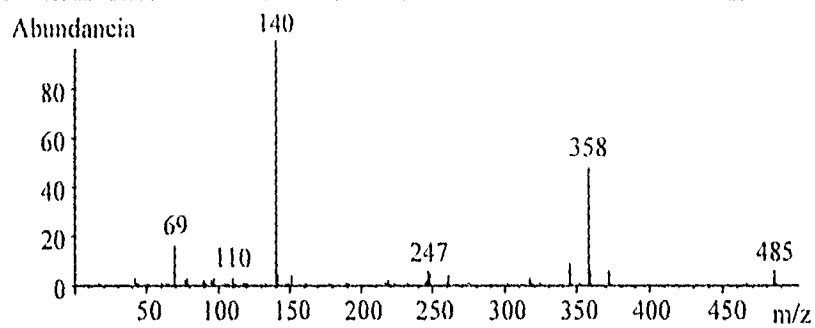


Figura 9. Espectro de masas de MN-TFA.

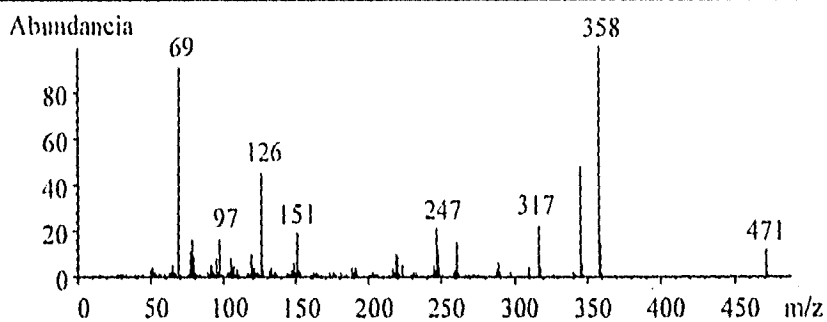


Figura 10. Espectro de masas de NMN-TFA.

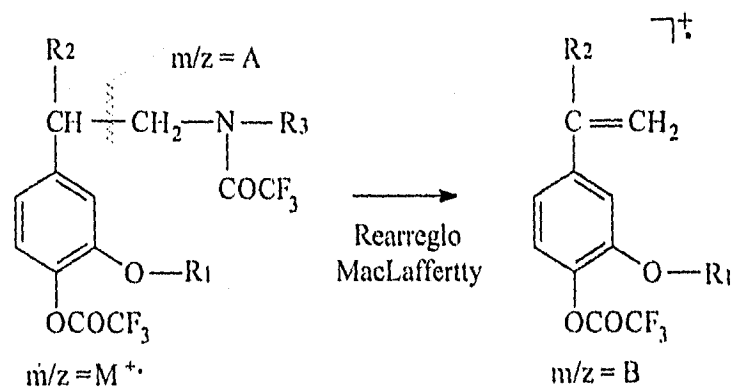


Figura 11. Esquema de fragmentación de las señales m/z principales. Los valores se encuentran en la Tabla 6.

Tabla 6. Señales m/z características de los derivados TFA.

	R1	R2	R3	M ⁺	A	B
NE	COCF ₃	OCOCF ₃	H	553	126	440
E	COCF ₃	OCOCF ₃	CH ₃	567	140	-
DA	COCF ₃	H	H	441	126	328
NMN	CH ₃	OCOCF ₃	H	471	126	358
MN	CH ₃	OCOCF ₃	CH ₃	485	140	358

Para la molécula de DOPA también se obtuvo un derivado estable. El cromatograma iónico de DOPA-TFA se muestra en la Figura 5. Debido a la posición de los grupos funcionales en este compuesto, se propone es una estructura de lactona (Figura 12). El espectro de masas de DOPA-TFA se muestra en la Figura 13 y una posible fragmentación de la estructura propuesta se encuentra en la Figura 14.

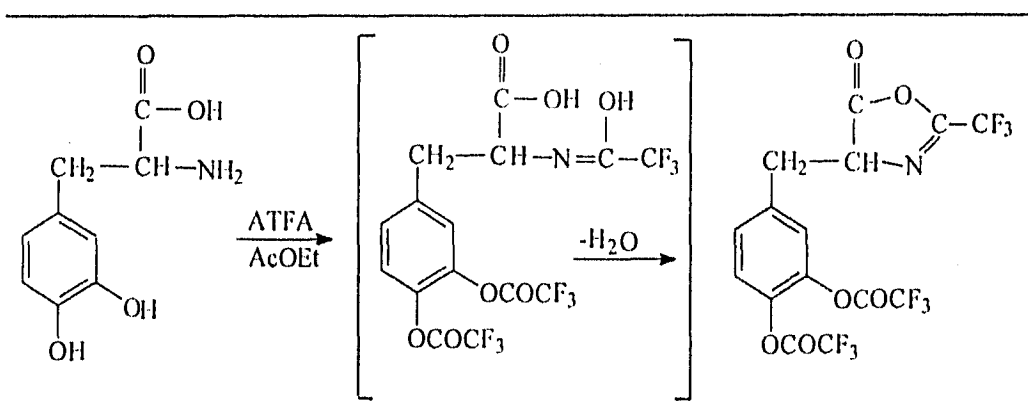


Figura 12. Estructura propuesta para el derivado DOPA-TFA.

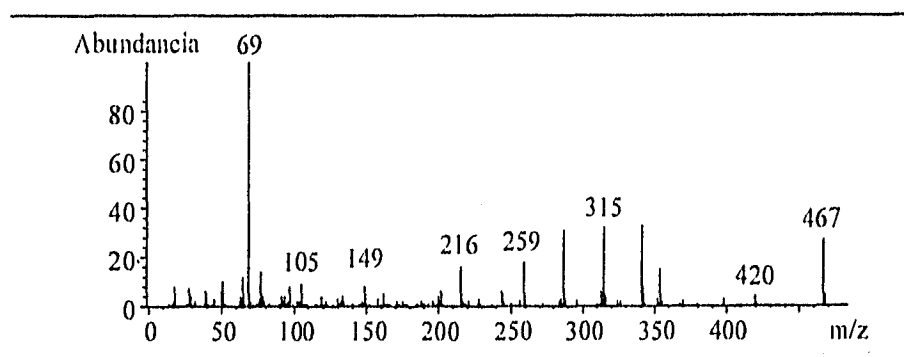


Figura 13. Espectro de masas de DOPA-TFA.

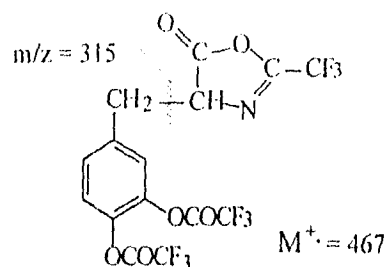


Figura 14. Esquema de fragmentación de un ion de DOPA-TFA.

Para las moléculas de DOPAC, HVA, DOMA, VMA y MHPG, que poseen un grupo carboxilo, el derivado formado con este procedimiento no siempre es el mismo, es parcial e inestable. A continuación, utilizando como modelo el HVA, se muestran los cromatogramas de tres soluciones igualmente preparadas de HVA. Como se observa en la Figura 15 el derivado resultante del grupo carboxilo probablemente es el correspondiente anhídrido (una posible estructura se muestra en la Figura 16) que, por la forma de los picos y por los espectros de masas se observa que sufre descomposición en el sistema cromatográfico, mientras que las Figuras 17 y 18 indican que posiblemente el grupo carboxilo está libre, lo que explica el "coleo" de los picos (la estructura se propone en la Figura 19) además, al igual que en la Figura 15, en la Figura 17 se observa la descomposición de los derivados en el sistema cromatográfico.

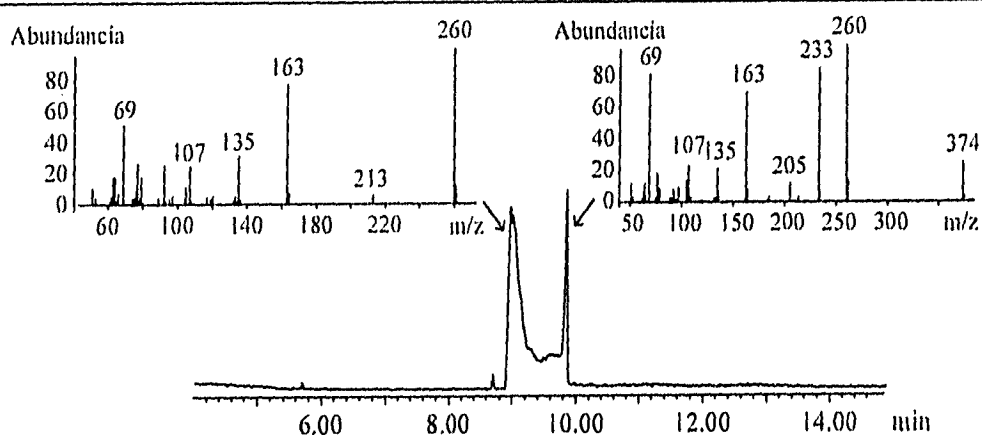


Figura 15. Cromatograma iónico y espectros de masa del derivado HVA-TFA.
 Temperatura final: 260°C durante 5.5 min. Las demás condiciones cromatográficas son las mismas que en la Figura 5.

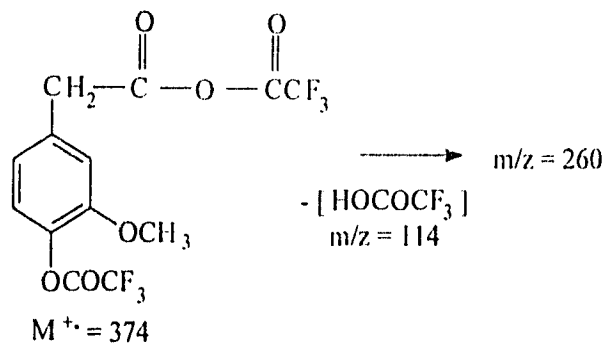


Figura 16. Estructura propuesta de los espectros de la Figura 15.

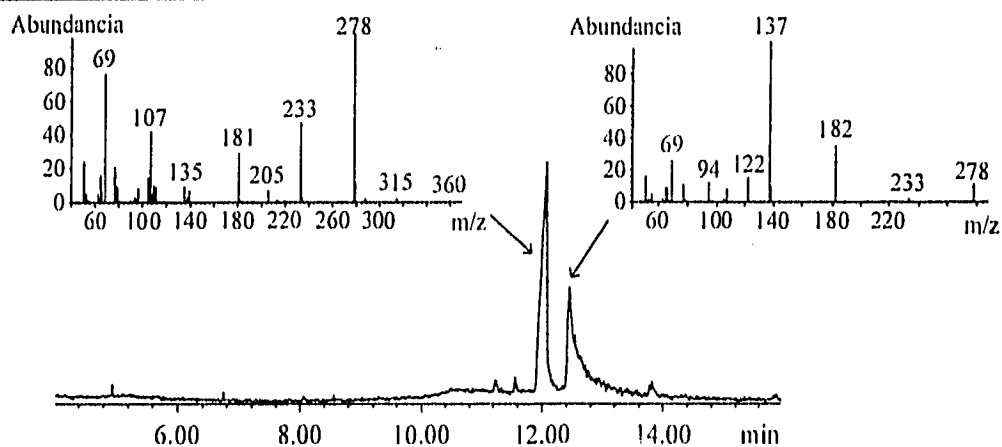


Figura 17. Cromatograma iónico y espectros de masa del derivado HVA-TFA. Temperatura final: 260°C durante 5.5 min. Las demás condiciones cromatográficas son las mismas que en la Figura 5.

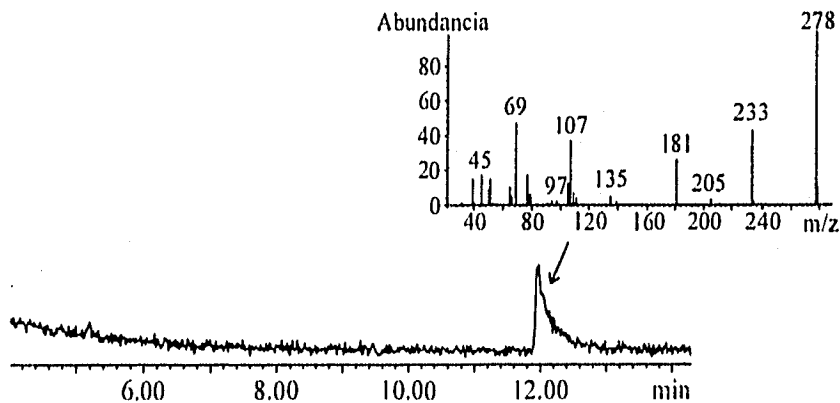
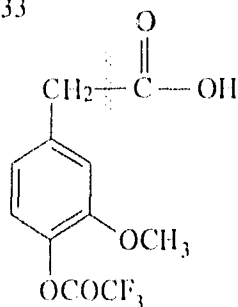


Figura 18. Cromatograma iónico y espectros de masa del derivado HVA-TFA. Temperatura final: 260°C durante 5.5 min. Las demás condiciones cromatográficas son las mismas que en la Figura 5.

$m/z = 233$



$M^+ = 278$

Figura 19. Estructura propuesta de los espectros de la Figuras 17 y 18.

Para este tipo de compuestos la literatura reporta la utilización de la mezcla ATFA/TFE (trifluoroetanol) ^{32,36} para formar con el carboxilo el éster resultante. En el laboratorio no se cuenta con TFE, así que, aunque la literatura menciona que la reacción es muy violenta con las mezclas ATFA/EtOH (etanol) o ATFA/MetOH³², se probaron diferentes proporciones de la mezcla ATFA/EtOH. En ningún caso se encontró algún derivado de estos compuestos. Se observó que la mezcla ATFA/EtOH no interfiere con los derivados de las moléculas que no poseen grupos carboxilo cuando la proporción de EtOH es muy pequeña (10:1), pero cuando la proporción aumenta (10:5) los derivados no se forman o se destruyen. Para el resto del trabajo sólo se estudiaron las moléculas que no poseen grupos ácidos y DOPA.

6.1.2. CG-EM de las soluciones para calibración.

Los cromatogramas de las soluciones para calibración y las obtenidas con DEFS muestran los mismos picos cromatográficos, simétricos y con una buena resolución como se muestra en el cromatograma iónico de la Figura 20. Los espectros de masas son los mismos en todos los casos (los analitos derivados independientemente, las soluciones para calibración y las soluciones obtenidas con DEFS).

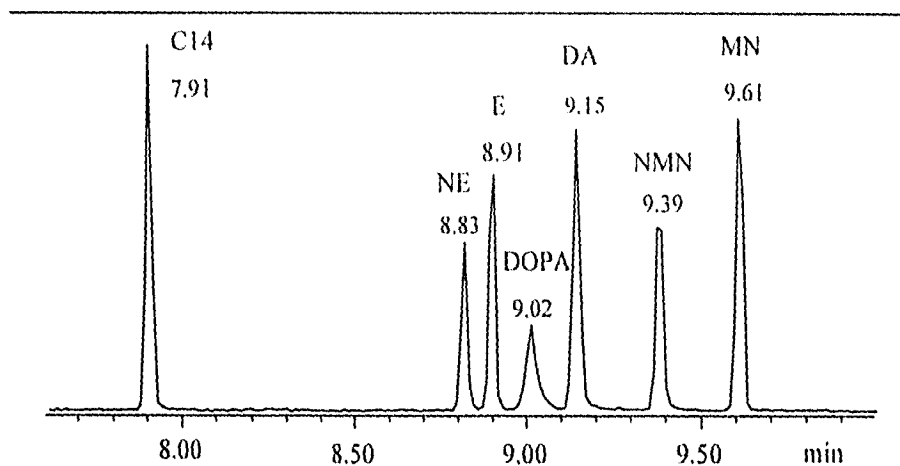


Figura 20. Cromatograma iónico de una muestra de calibración.
 0.1mg de cada analito en 100 mg de Chromosorb.
 Condiciones cromatográficas igual que en la Figura 5.

6.1.3. Repetibilidad, reproducibilidad y estabilidad de las soluciones para calibración.

La repetibilidad entre inyecciones y entre soluciones para calibración es 3.0% y 7.1% respectivamente (desviación estandar relativa). Esta diferencia es significativa y es resultado de la heterogeneidad y de la reproducibilidad de la reacción de derivación. Para investigar la estabilidad de los derivados, las soluciones se guardaron a temperatura ambiente y a 4°C, los resultados mostraron que a temperatura ambiente la descomposición se detecta a las 4 hr. mientras que a 4°C las muestras son estables por 24 hrs (Fig 21).

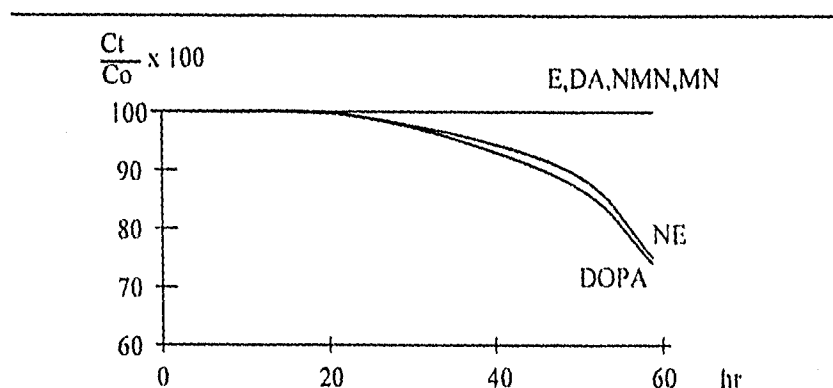


Figura 21. Descomposición de las muestras para calibración almacenadas a 4°C en función del tiempo. Co=Concentración inicial, Ct=Concenteracion al tiempo t.

6.2. Derivación y extracción con CO₂ supercrítico.

6.2.1. Parámetros de operación constantes.

Flujo y volumen de disolvente.

Se encontró que el recobro es independiente del flujo de AcOEt que se fijó a una velocidad intermedia (1 ml/min) y se demostró que 1 ml de AcOEt es un volumen suficiente para eluir completamente los derivados de la trampa de acero inoxidable.

Flujo del CO₂.

El recobro es independiente del flujo de CO₂, por lo que para ahorrar tiempo se fijó a 4 mL/min (Fig 22 y Tabla 7).

Número de volúmenes de lavado.

La Figura 22 muestra los resultados del recobro (%R) del derivado de DA en función del número de volúmenes de lavado, donde al igual que para los otros compuestos se observa que con 6 volúmenes de lavado se ha alcanzado prácticamente el recobro máximo. Para el resto de los experimentos el número de volúmenes de lavado se fijó en 7.

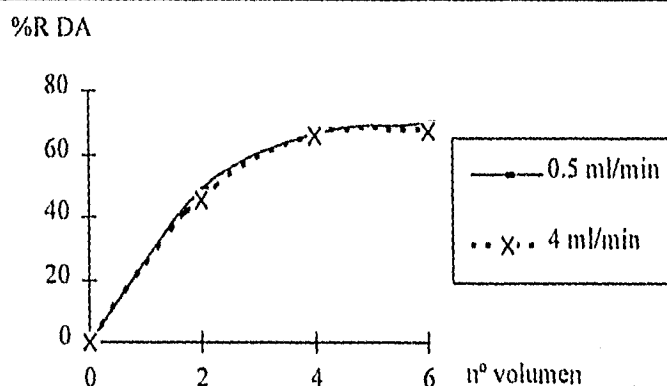


Figura 22. Recobro en función del número de volúmenes de lavado.

Tabla 7. *Recobro en función del flujo de CO₂*.

	0.5ml/min	4ml/min
NE	64.4	69.5
E	68.0	74.0
DOPA	64.1	60.2
DA	69.7	67.7
NMN	78.6	72.3
MN	74.9	71.4

6.2.2. EFS de las catecolaminas y compuestos relacionados sin derivar.

En todas las condiciones estudiadas se encontró que no hay extracción de los compuestos sin derivar (Figura 23), éstos permanecen en el Chromosorb de la celda de extracción (Figura 24).

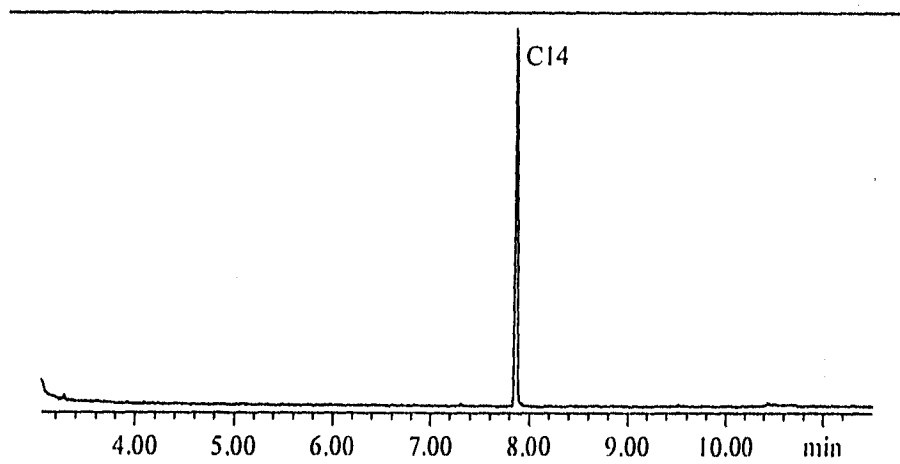


Figura 23. *Cromatograma iónico de EFS de Chromosorb/analitos. Condiciones cromatográficas igual que en la Figura 5.*

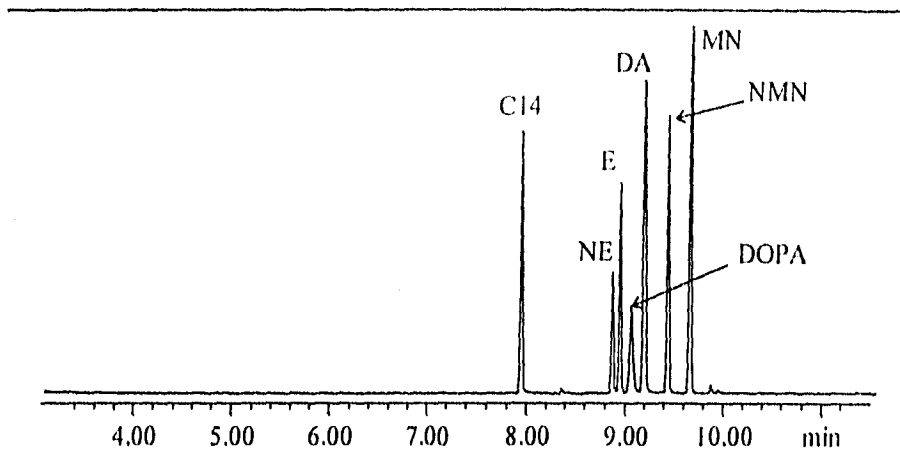


Figura 24. *Cromatograma iónico de la muestra de Chromosorb/analitos después de la EFS. Condiciones cromatográficas igual que en la Figura 5.*

6.2.3. Estabilidad de las soluciones obtenidas con DEFS.

Bajo las mismas condiciones de almacenamiento (4°C) las soluciones obtenidas con DEFS son menos estables que las soluciones de calibración. Las soluciones para calibración son estables por 24 hr (Figura 21) mientras que las soluciones obtenidas con DEFS muestran pérdidas en ese mismo tiempo que van de 15% (MN) a 85% (NE). La Figura 25 muestra la gráfica de descomposición de las soluciones obtenidas con DEFS durante las primeras 4 hr. La adición de de 10 µL de ATFA a las soluciones obtenidas con DEFS aumenta la estabilidad de los derivados durante 4 hr, lo que es tiempo suficiente para analizar las muestras. La Figura 26 muestra la gráfica de descomposición durante las primeras 12 hr de las soluciones obtenidas con DEFS adicionadas con 10 µL ATFA.

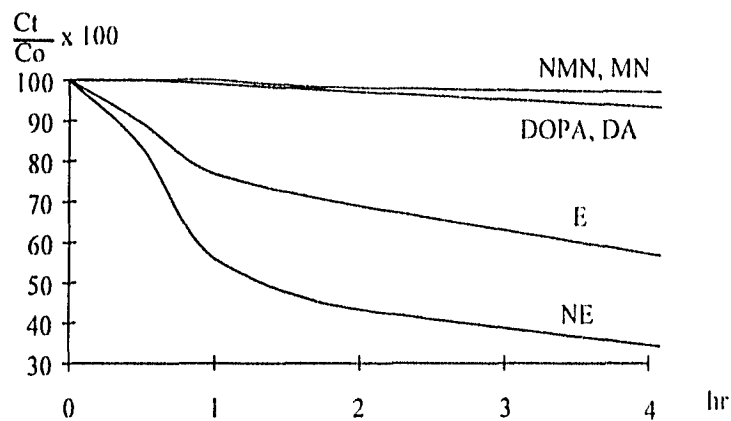


Figura 25. Descomposición de las soluciones obtenidas con DEFS en función del tiempo. C_o =Concentración inicial, C_t =Concentración a tiempo t .

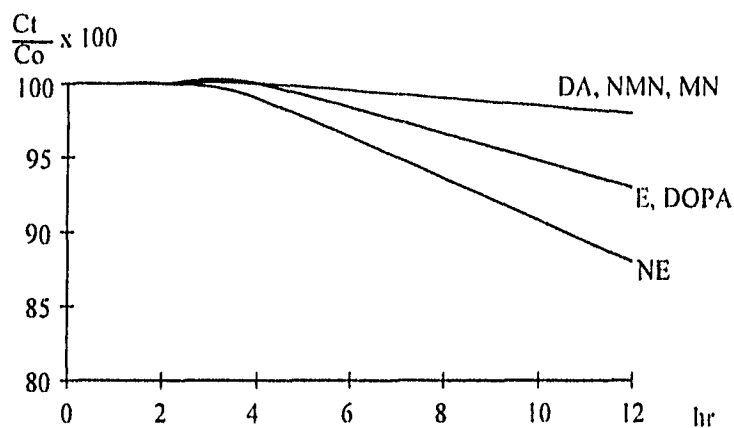


Figura 26. Descomposición de las soluciones obtenidas con DEFS adicionadas con 10 μ L ATFA en función del tiempo. C_o =Concentración inicial, C_t =Concentración a tiempo t .

6.2.4. DEFS de las muestras para calibración. Influencia de la temperatura, la densidad, el tiempo de extracción estática y el cosolvente.

La Tabla 8 muestra los recobros de los compuestos estudiados en el experimento factorial 2^4 . El análisis de estos resultados muestra que el efecto más importante es la adición de cosolvente que reduce el recobro de los derivados en un factor de dos. Este

resultado fue inesperado ya que en el procedimiento usual los derivados se sintetizan más rápido con la adición de AcOEt al ATFA. La opción de derivación incompleta se descartó al analizar algunas de las muestras de Chromosorb de la celda después de la extracción ya que no se encontró ningún pico, ver el cromatograma de la Figura 27.

Tabla 8 *Resultados del Diseño Experimental 2^a*

	Nivel del Factor				Respuesta (recobro %)					
	A	B	C	D	DOPA	DA	NE	E	M	NMN
1	-	-	-	-	91.4	86.1	26.7	43.8	97.7	105.4
2	+	-	-	-	92.8	90.1	82.7	81.2	96.6	99.6
3	-	+	-	-	24.7	75.1	53.4	58.4	81.2	84.3
4	+	+	-	-	92.2	94.0	85.8	85.9	99.5	102.2
5	-	-	+	-	84.8	78.7	21.5	39.2	90.9	94.9
6	+	-	+	-	44.0	74.3	54.5	61.3	78.2	77.0
7	-	+	+	-	65.7	83.4	67.3	74.5	93.0	94.9
8	+	+	+	-	37.0	86.6	76.8	78.3	88.5	89.2
9	-	-	-	+	19.3	28.5	6.4	10.1	42.6	40.3
10	+	-	-	+	41.1	43.8	18.0	26.5	51.1	51.6
11	-	+	-	+	21.5	25.2	17.6	19.1	32.1	28
12	+	+	-	+	62.4	72.5	48.9	54.5	80.6	82.5
13	-	-	+	+	19.5	23.7	4.3	8.1	35.3	31.3
14	+	-	+	+	16.2	52.1	33.5	37.4	52.1	46.1
15	-	+	+	+	22.3	28.4	22.9	25.3	31.6	32.3
16	+	+	+	+	21.1	49.4	43.8	44.6	50.4	50.8

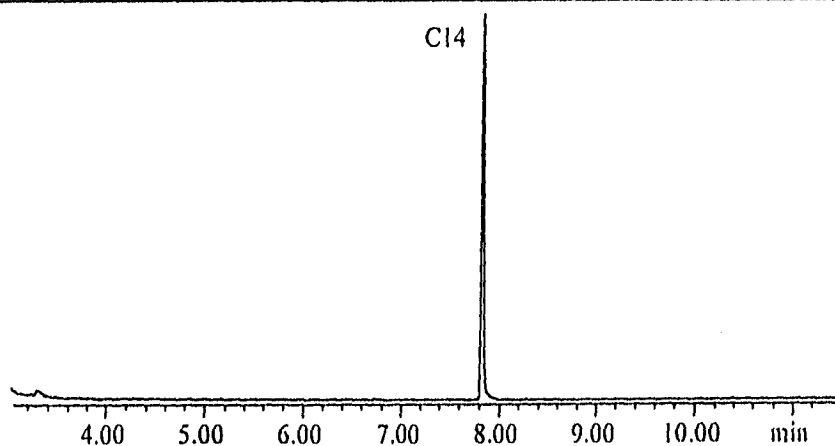


Figura 27. *Cromatograma iónico del Chromosorb de la celda después de la DEFS. Condiciones cromatográficas igual que en la Figura 5.*

Los resultados indican que los derivados más inestables como son NE y E tienen recobros menores mientras que los más estables como NMN y MN tienen los recobros más altos. Sin embargo, el efecto de la adición de cosolvente es tan grande que no permite concluir si existen otras interacciones. Este experimento se realizó sin adicionar a los viales 10 µL de ATFA y el tiempo entre la extracción y el análisis de las muestras no fue inmediato ni igual para todas las muestras. El experimento se repitió sin el factor cosolvente, adicionando 10 µL de ATFA a los viales y realizando una réplica, los resultados se muestran en la Tabla 9 y el promedio, la desviación estándar relativa al interior y entre factores en la Tabla 10. Este experimento mostró que la reproducibilidad está limitada por la metodología de calibración (la D.S. al interior de cada factor es mayor que la D.S. entre factores) y que ninguno de los factores aquí estudiados tiene efecto significativo, es decir, que el recobro no depende de la temperatura, la presión o el tiempo en los intervalos estudiados.

Tabla 9 *Resultados del Diseño Experimental 2³ con réplica*

Nivel			Respuesta (recobro %)					
A	B	C	DOPA	DA	NE	E	MN	NMN
1	-	-	88.4 / 89.0	81.5 / 81.5	76.0 / 79.8	68.8 / 72.9	78.3 / 79.6	85.6 / 85.7
2	+	-	100.3/93.9	93.0 / 73.3	85.0 / 69.2	77.7 / 64.4	89.3 / 70.4	96.9 / 74.1
3	-	+	85.6/85.0	89.1 / 90.8	87.6 / 93.7	78.6 / 88.3	87.8 / 95.0	93.8 / 94.4
4	+	+	102.2/104.0	81.9 / 71.9	66.6 / 76.8	66.3 / 66.9	79.0 / 67.9	83.8 / 71.7
5	-	-	108.9/106.3	92.0 / 77.4	79.9 / 86.2	77.2 / 72.7	91.3 / 73.5	97.6 / 78.3
6	+	-	74.9 / 116.0	86.3 / 112.7	64.9 / 102.8	66.9 / 92.6	83.0 / 103.8	88.8 / 112.4
7	-	+	103.6 / 94.9	92.8 / 75.5	86.1 / 64.6	78.6 / 64.4	88.6 / 72.8	96.7 / 78.1
8	+	+	92.5 / 98.6	90.6 / 91.6	82.6 / 71.1	77.6 / 70.7	86.1 / 86.8	92.5 / 95.8

Tabla 10 *Promedio del recobro del Diseño Experimental 2³ con réplica*

	% R	D.S. al interior (reproducibilidad)	D.S. entre factores
DOPA	96.4	6.2	4.8
DA	86.4	8.0	6.8
NE	79.6	10	0.7
E	74.2	7.0	2.3
MN	83.9	8.2	5.3
NMN	89.1	8.9	6
Promedio	84.8	8.1	4.3

6.3. DEFS de cáscara de plátano y de glándula suprarrenal.

6.3.1. Cáscara de plátano.

La Figura 28 muestra el cromatograma de alta temperatura de la segunda EFS de la cáscara de plátano, donde al igual que la primera extracción se identificaron triglicéridos de NC48 a NC50. La Figura 29 muestra por CG-EM los ésteres métilicos de los ácidos grasos para la misma muestra que van de C:16 a C:18.

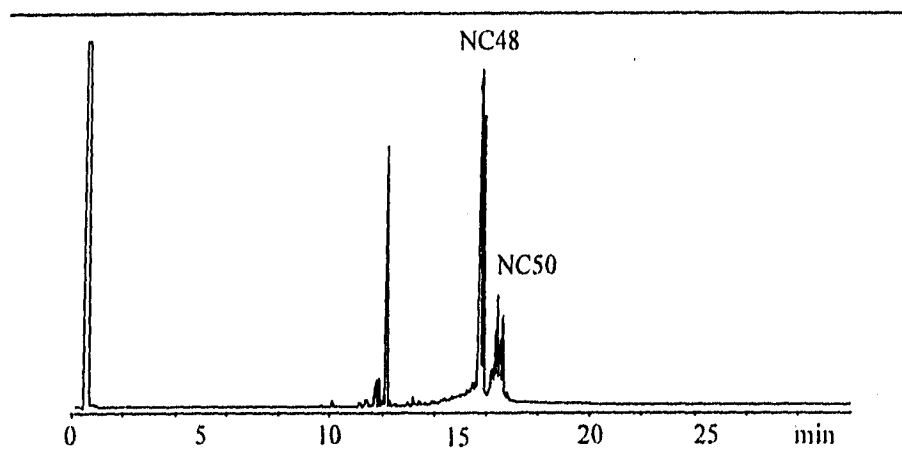


Figura 28. Cromatograma de alta temperatura. Segunda EFS de cáscara de plátano seca. Columna SPB (10m x 0.25mm D.I., 0.25 μ m), 4.45 ml/min de He. Programa de temperatura: 60°C incrementándose a 20 °C/min hasta 350°C durante 15 min. Inyección en columna (oven track on). Detector de ionización de llama: 350°C.

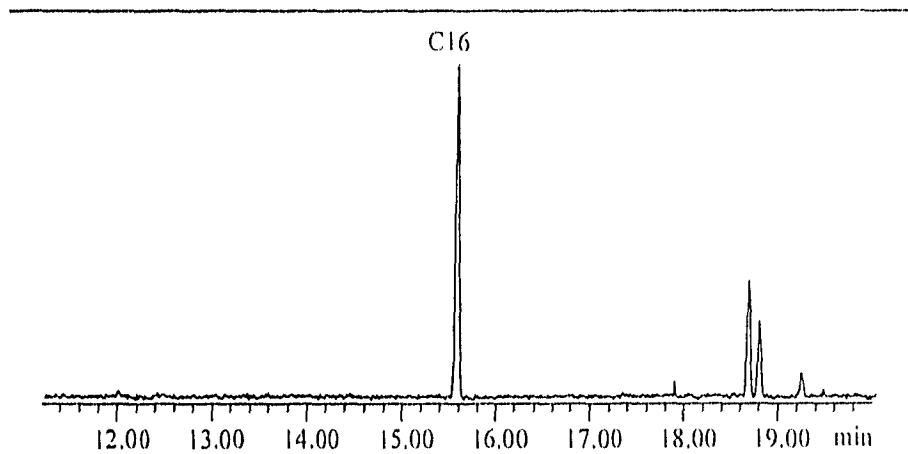


Figura 29. Cromatograma iónico de los esteres metílicos de ácidos grasos de la segunda EFS de cáscara de plátano seca. Condiciones cromatográficas igual que en la Figura 5.

En la DEFS se extrajo una concentración DA del orden de 0.55 mg por g de tejido. La Figura 30-a muestra el análisis por CG-EM de la solución obtenida con DEFS. El cromatograma de una segunda extracción (Fig 30-b) demuestra que la extracción fue exhaustiva.

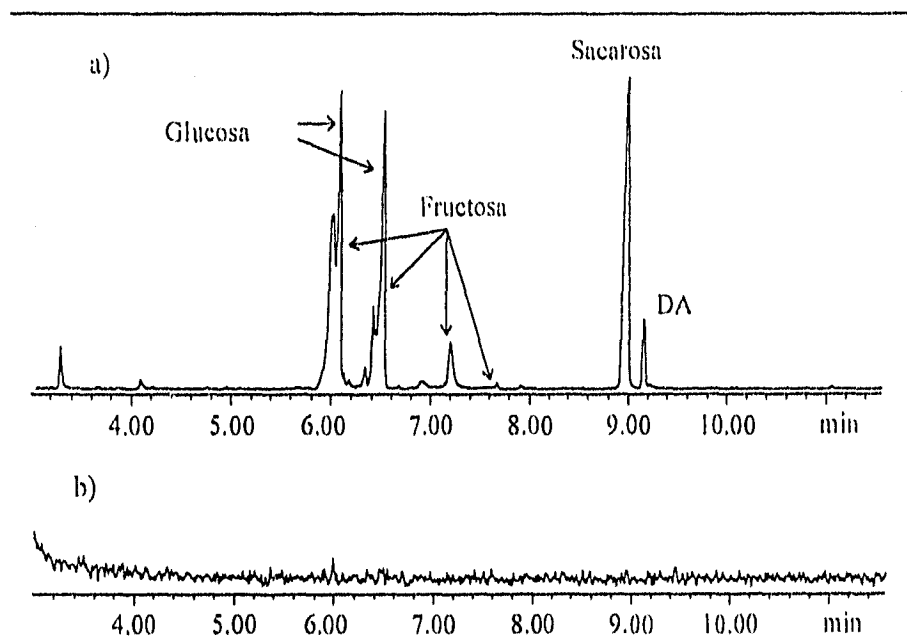


Figura 30. Cromatogramas iónicos de a) primera y b) segunda DEFS de 11.5 mg de cáscara de plátano seca. Condiciones cromatográficas igual que en la Figura 5.

En los cromatogramas de la Figura 30 también se puede observar la DEFS exhaustiva de Azúcares-TFA como son: glucosa, fructosa y sacarosa, que se identificaron por comparación con los tiempos de retención y espectros de masas de estándares.

6.3.2. Glándula suprarrenal

En los cromatogramas de alta temperatura de la primera y segunda EFS de la glándula suprarrenal se identificaron triglicéridos de NC44 a NC54. La Figura 31 muestra el cromatograma de alta temperatura de la segunda EFS de la glándula suprarrenal. La Figura 32 muestra por CG-EM los ésteres métilicos de los ácidos grasos para la misma muestra que van de C:14 a C:18.

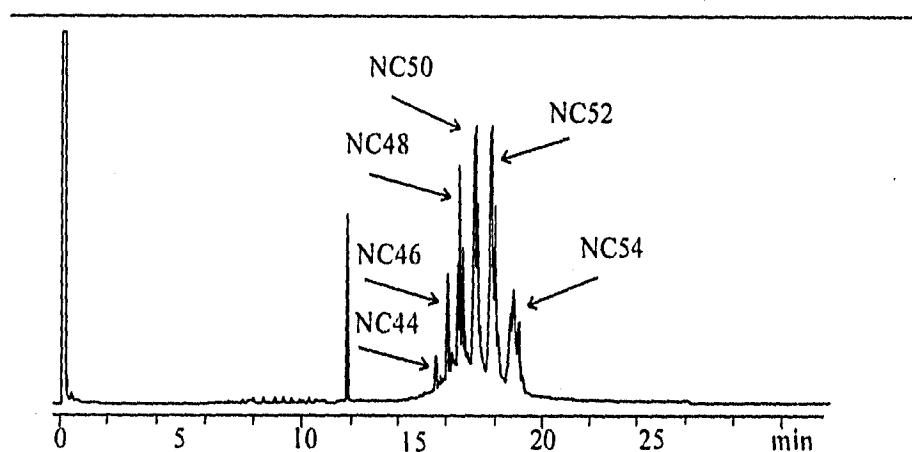


Figura 31. Cromatograma de alta temperatura. Segunda EFS de glándula adrenal. Condiciones cromatográficas igual que en la Figura 28.

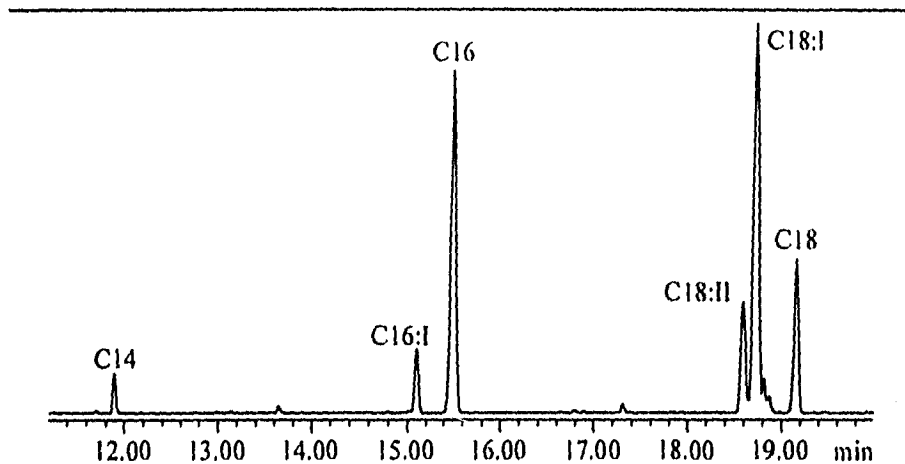


Figura 32. Cromatograma iónico de los esteres metílicos de ácidos grasos de la segunda EFS de glándula adrenal. Condiciones cromatográficas igual que en la Figura 5.

En la DEFS se extrajo una concentración E del orden de 0.35 mg por g de tejido húmedo y en menor concentración NE, DA, NMN y MN. La Figura 33-a muestra el análisis por CG-EM de la solución obtenida con DEFS. El cromatograma de una segunda extracción (Fig 33-b) demuestra que la extracción fue exhaustiva.

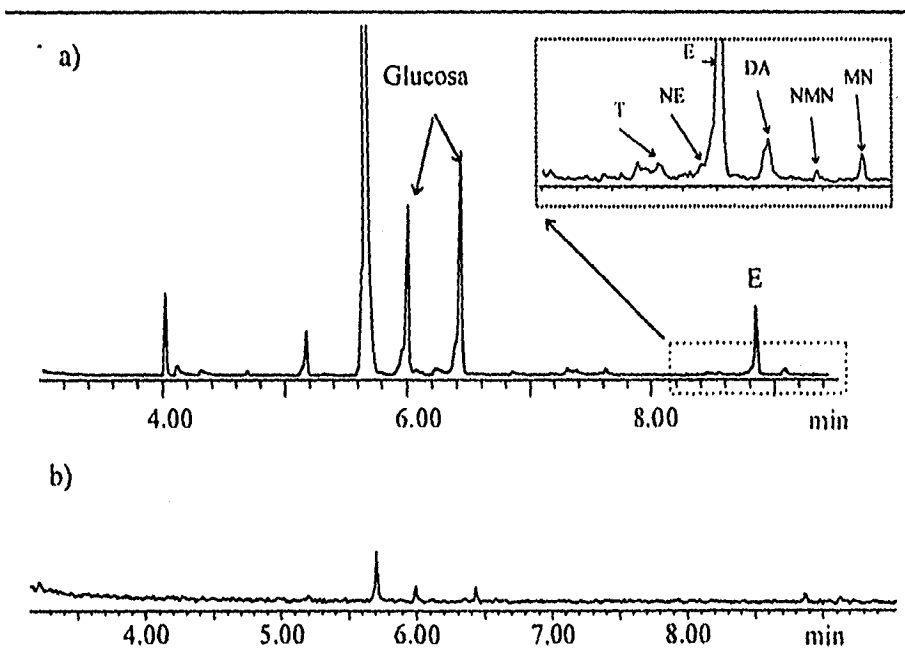


Figura 33. Cromatogramas iónicos de a) primera y b) segunda DEFS de 0.05 mg de glándula adrenal. Las condiciones son las mismas de la Figura 5.

Entre los compuestos que se derivaron y extrajeron con CO₂ supercrítico se identificó el precursor de DOPA, el aminoácido Tirosina (T), que al igual que la glucosa, se identificó por comparación con los tiempos de retención y espectros de sus respectivos estándares. El espectro y probable estructura del derivado de la Tirosina se muestran en las Figuras 34 y 35.

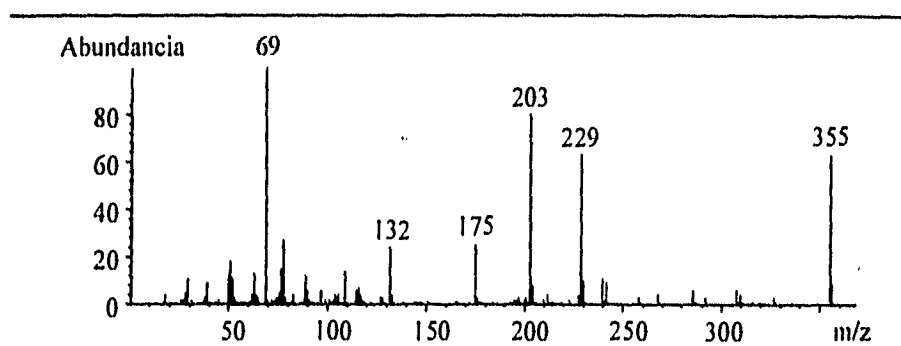


Figura 34. Espectro de masas de Tirosina-TFA.

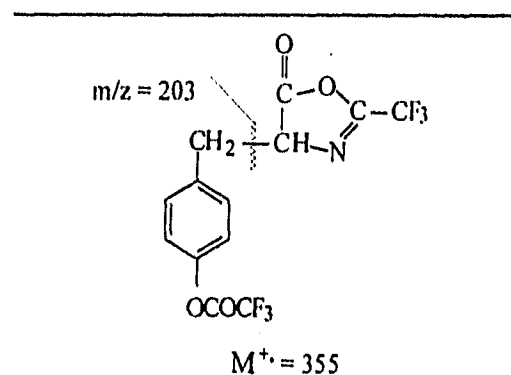


Figura 35. Esquema de fragmentación de un ion de Tirosina-TFA.

7.- CONCLUSIONES

Se alcanzaron los objetivos planteados inicialmente:

- 1) Las catecolaminas y algunos de sus metabolitos, junto con otras moléculas altamente polares como los azúcares (mono y disacáridos), pueden ser extraídas con DEFS usando ATFA como agente derivante y CO₂ supercrítico como disolvente.
- 2)
- 3) Se demostró que se puede diseñar un esquema donde el primer paso sea EFS para eliminar compuestos no polares como son los triglicéridos.

Con el trabajo realizado se concluye que:

- Con el uso de ATFA los derivados son fácilmente formados y extraídos.
- Se obtienen recobros tan altos como 94 %.
- La DEFS se realiza en 40 min y el extracto puede ser analizado sin ningún otro tipo de tratamiento por CGC convencional.
- El recobro no depende, en los intervalos estudiados, de la temperatura, la presión o el tiempo de extracción.
- El uso de AcOEt como codisolvente reduce el recobro en un 50 %.
- Las muestras se deben analizar inmediatamente ó almacenar, hasta por 4 hr, a 4°C con 10 µL de ATFA.
- El método permite usar pequeñas cantidades de muestra (50 mg) y elimina manipulaciones que consumen tiempo.
- En la EFS de la cáscara de plátano tabasco se extrajeron triglicéridos de NC48 a NC50
- En la EFS de la glándula suprarrenal se extrajeron triglicéridos de NC44 a NC54.
- En la DEFS de la cáscara de plátano se cuantificó DA e identificaron glucosa, fructosa y sacarosa.
- En la DEFS de la glándula suprarrenal se cuantificó E e identificaron NE, DA, NMN, MN, T y glucosa.

La técnica de DEFS se encuentra en sus inicios y como el comportamiento de los disolventes líquidos no se puede extrapolar al del medio supercrítico (como lo demostró la presencia del codisolvente que bajó el rendimiento de extracción) no es fácil predecir los resultados de las reacciones en estos medios. Se espera que los resultados obtenidos en este trabajo contribuyan en el avance del conocimiento de la DEFS. A continuación se indican recomendaciones de operación y posibles caminos para la continuación de este trabajo.

- Llevar a cabo la DEFS en línea con un sistema cromatográfico para resolver el problema de la baja estabilidad de los derivados en solución, aumentar la sensibilidad del método y eliminar la necesidad de utilizar una trampa. Si la trampa no está perfectamente limpia el recobro de los compuestos derivados puede disminuir hasta ser nulo ya sea porque los derivados pueden no retenerse durante la extracción, retenerse durante la elución o descomponerse.
- Realizar la DEFS con otros derivantes o en 2 pasos, es decir con dos reactivos derivantes. Por ejemplo, para extraer los metabolitos de catecolaminas con grupo ácido se puede pensar en realizar una primera DEFS con un reactivo que derive el grupo ácido (por ejemplo metilarlo) y posteriormente la DEFS con ATFA.
- Investigar el mecanismo en que la reacción de DEFS se lleva a cabo, el porqué del efecto del codisolvente AcOEt y el de otros codisolventes.
- Demostrar la cuantitatividad de la DEFS en matrices reales realizando el estudio junto con un método de referencia.

REFERENCIAS

- 1) T. L. Chester, J.D. Pinkson and D. E. Raynie, Supercritical Fluid Chromatography and Extraction, *Anal. Chem.*, 64 (1992) 153R-170R.
- 2) T. L. Chester, J.D. Pinkson and D. E. Raynie, Supercritical Fluid Chromatography and Extraction, *Anal. Chem.*, 66 (1994) 106R-130R.
- 3) C. R. Knipe, D. R. Gere and M. E. P. McNally, Supercritical Fluid Extraction, Chapter 18, Hewlett-Packard Company, ACS, 1992.
- 4) W. S. Miles and L. G. Randal, Supercritical Fluid Extraction in the Analytical Laboratory, Chapter 19, Hewlett-Packard Company, ACS, 1992.
- 5) S. B. Hawthorne, M. S. Krieger and D. J. Miller, Analysis of Flavor and Fragrance Compounds Using Supercritical Fluid Extraction Coupled with Gas Chromatography, *Anal. Chem.*, 60 (1988) 472-477.
- 6) M. M. Schantz and S. N. Chesles, Supercritical Fluid Extraction for Removal of Trace Organic Species from Solid Samples, *J. Chromatogr.*, 363 (1986) 397-401.
- 7) P. R. McEachern and G. D. Foster, Supercritical Fluid Extraction of Sintetic Organoclorine Compounds in Submerged Aquatic Plants, *J. Chromatogr.*, 632 (1993) 119-125.
- 8) P. Subra and P. Boissinot. Supercritical Fluid Extraction from Brown Alga by Stagewise Pressure Increase, *J. Chromatogr.*, 543 (1991) 413-424.
- 9) N. Alexandrou and J. Pawliszyn, Supercritical Fluid Extraction for the Rapid Determination of Polichlorinated Dibenzo-p-dioxins and Dibenzofurans in Municipal Incineration Fly Ash, *Anal. Chem.*, 61 (1989) 2770-2776.
- 10) S. B. Hawthorne, D. J. Miller and J. J. Langenfeld, Quantitative Analysis Using Directly Coupled Supercritical Fluid Extraction-Capillary Chromatography (SFE-GC) With a Conventinal Split/Splitless Injection Port, *J. Chromatogr. Sci.*, 28 (1990) 2-8.
- 11) D.E. Raynie, Warning Concerning the use of Nitrous Oxide in Supercritical Fluid Extraction, *Anal. Chem.*, 65 (1993) 3127-3128.
- 12) S. B. Hawthorne, J. J. Langenfeld, D. J. Miller and M. D. Burfor, Comparison of Supercritical CHClF_2 , N_2O and CO_2 for the Extraction of Poliehlorinaten Biphenils and Policyclic Aromatic Hydrocarbons, *Anal. Chem.*, 60 (1992) 1614-1622.
- 13) S. F. Y. Li, C. P. Ong, M. L. Lee and H. K. Lee, Supercritical Fluid Extraction and Chromatography of Steroids with Freon-22, *J. Chromatogr.*, 515 (1990) 515-520.
- 14) A. L. Howard, D. J. Yoo and L. T. Taylor, Supercritical Fluid Extraction of Environmental Analytes Using Trifluoromethane, *J. Chromatogr. Sci.*, 31 (1993) 401-408.

- 15) S. B. Hawthorne, Y. Yang and D. J. Miller, Extraction of Organic Pollutants from Environmental Solid with Sub- and Supercritical Water, *Anal. Chem.*, 66 (1994) 2912.
- 16) S. B. Hawthorne, D. J. Miller, D. E. Whittington and B. L. Moore, Quantitative Extraction of Alkylbenzenesulfonates Using Supercritical Carbon Dioxide and Simple Device for Adding Modifiers, *J. Chromatogr.*, 541 (1991) 185-194.
- 17) J. J. Langenfeld, S. B. Hawthorne, D. J. Miller and J. Pawliszyn, Role of Modifier for Analytical Scale Supercritical Fluid Extraction of Environmental Samples, *Anal. Chem.*, 66 (1994) 909-916.
- 18) R. M. Smith and M. D. Burford, Optimization of Supercritical Fluid Extraction of Volatile Constituents from a Model Plant Matrix, *J. Chromatogr.*, 600 (1992) 175-181.
- 19) J. W. Hills, H. H. Hill Jr. and T. Maeda, Simultaneous Supercritical Fluid Derivatization and Extraction, *Anal. Chem.*, 63 (1991) 2152-2155.
- 20) S. B. Hawthorne, D. J. Miller and J. J. Langenfeld, "Supercritical Fluid Extraction of Polar Analytes Using Modified CO₂ and *In Situ* Chemical Derivation" In: Supercritical Fluid Technology, F. V. Bright and M. E. P. McNally (Editors) ACS, pp 165-178.
- 21) S. B. Hawthorne, D. J. Miller, D. E. Nivens and D. C. White, Supercritical Fluid Extraction of Polar Analytes Using *In Situ* Chemical Derivation, *Anal. Chem.*, 64 (1992) 405-412.
- 22) H. B. Lee, T. E. Peart and R. L. Hongyou, *In Situ* Extraction of Pentachlorophenol and Related Compounds from Soil Using a Supercritical Fluid Extraction System, *J. Chromatogr.*, 605 (1992), 109-113.
- 23) J. W. King, J. E. France and J. M. Snyder, On-line Supercritical Fluid Extraction-Supercritical Fluid Reaction-Capillary Gas Chromatography Analysis of the Fatty Acid Composition of Oilseeds, *Fresenius' J. Anal. Chem.*, 344 (1992) 474-478.
- 24) R. Hillmann and K. Bachmann, On-Line Supercritical Fluid Derivatization and Extraction-Capillary Gas Chromatography of Polar Compounds, *J. High Resolution Chromatography*, 17 (1994) 350-325.
- 25) V. Lopez-Avila, N.S. Dodhiwala and W.F. Beckert, Developments in the Supercritical Fluid Extraction of Chlorophenoxy Acid Herbicides from Soil Samples, *J. Agric. Food Chem.*, 41 (1993) 2038-2044.
- 26) J. W. Hills and H. H. Hill, Carbon Dioxide Supercritical Fluid Extraction with a Reactive Solvent Modifier for the Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, *J. Chromatogr. Sci.*, 31 (1993) 6-12.
- 27) H. B. Lee, T. E. Peart and R. L. Hongyou, Determination of Phenolics from Sediments of Pulp Mill Origin by *In Situ* Supercritical Carbon Dioxide Extraction and Derivatization, *J. Chromatogr.*, 636 (1993) 263-270.

- 28) Y. Cal, R. Alzaga and J.M. Bayona, *In Situ* Derivatization and Supercritical Fluid Extraction for the Simultaneous Determination of Butyltin and Phenyltin Compounds in Sediment, *Anal. Chem.*, 66 (1994) 1161-1167.
- 29) M. Y. Croft, E. J. Murby and R. J. Wells, Simultaneous Extraction and Methylation of Chlorophenoxyacetic Acid from Aqueous Solution Using Supercritical Carbon Dioxide as a Phase Transfer Solvent, *Anal. Chem.*, 66 (1994) 4459-4465.
- 30) M. P. Llompart, R. A. Lorenzo, and R. Cela, Multivalent Optimization of Supercritical Fluid Derivatization and Extraction of Phenol in Soil Samples, *J. Chromatogr. Sci.*, 34 (1996) 43-51.
- 31) D. Faridiaz and P. Markakis, Amines In Fermented Fish Paste, *J. Food Sci.*, 44 (1979) 1562-1563.
- 32) M. W. Duncan, G. A. Smythe and P. S. Clezy, Gas Chromatographic/Mass Spectrometric Methodology for Simultaneous Assay of Salsolinol, Dopamine, Norepinephrine, Dihydroxyphenylacetic Acid and Dihydroxyphenylethanol. *Biomedical Mass Spectrometry*, 12 (1985) 106-114.
- 33) J. Herranen, A. Huhticangas, H. Tirronen, T. Halonen, H. Huuskonen, K. Reinikainen and P. Riekkinen, Quantification of a Number of Biogenic Amines and their Metabolites in Brain Homogenates by Gas Chromatography-Mass. *J. Chromatogr.*, 307 (1984) 241-249.
- 34) K. F. Faull, P. J. Anderson, J. D. Barchas and P. A. Berger, Selected Ion Monitoring Assay for Biogenic Amine Metabolites and Probenecid in Human Lumbar Cerebrospinal Fluid, *J. Chromatogr.*, 163 (1979) 337-349.
- 35) M. B. Mattammal and H. D. Chung, R. Strong, Confirmation of Dopamine Metabolite in Parkinsonian Brain Tissue by Gas Chromatography-Mass Spectrometry, *J. Chromatogr.*, 614 (1993) 205-212.
- 36) M. W. Duncan, G.A. Smythe and M.V. Nicholson, Comparison of High-Performance Liquid Chromatography with electrochemical Detection and Gas Chromatography-Mass-Fragmentography for the Assay of Salsolinol, Dopamine and Dopamine Metabolites in Food and Beverage Samples, *J. Chromatogr.*, 336 (1984) 199-209.
- 37) J. Odink, H. Sandman, W.H.P. Schreurs, Determination of Free and Total Catecholamines and Salsolinol in Urine by Ion-Pair Reversed-Phase Liquid Chromatography with Electrochemical Detection after a one-step Sample Clean-Up, *J. Chromatogr.*, 377 (1986) 145-154.
- 38) J. B. Nair, M. N. Munk, J. D. McLean, Improved High-Performance Liquid Chromatographic Method with Electrochemical Detection for the Determination of Urinary Catecholamines Using a New Electrochemical Detector, *J. Chromatogr.*, 416 (1987) 340-346.

- 39) T. Soga, Y. Inoue, Determination of Catecholamines in Urine and Plasma by On-Line Sample Pretreatment Using an Internal Surface Boronic Acid Gel, *J. Chromatogr.*, 620 (1993) 175-181.
- 40) Britt-Marie Eriksson and M. Wikström, Determination of Catecholamines in Urine by Liquid Chromatography and Electrochemical Detection After On-Line Sample Purification on Immobilized Boronic Acid, *J. Chromatogr.*, 593 (1992) 185-190.
- 41) F. V. J. Van Der Hoorn, F. Boomsma, J. Man In'T Veld and M. A. D. H. Schalekamp, Improved measurement of urinary catecholamines by liquid-liquid extraction, derivatization and high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection, *J. Chromatogr.*, 563(1991) 348-355, Biomedical Applications.
- 42) H. Nohta, E. Yamaguchi, Y. Ohkura and H. Watanabe, Measurement of Catecholamines, their Precursor and Metabolites in Human Urine and Plasma by Solid-Phase Extraction Followed by High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Derivatization, *J. Chromatogr.*, 493 (1989) 15-26.
- 43) G. M. Anderson, T. A. Durkin, J. B. Morton and D. J. Cohen, Liquid Chromatographic Determination of Urinary Catecholamines after One-Step Alumina Extraction, *J. Chromatogr.*, 424 (1988) 373-377.
- 44) M. Hamaji and T. Seki, Estimation of Catecholamines in Human Plasma by Ion-Exchange Chromatography Coupled with Fluorometry, *J. Chromatogr.*, 163 (1979) 329-336.
- 45) Luque de Castro, M. D. Valcárcel, M. T. Tena. Extracción con fluidos supercríticos en el proceso analítico. 1993. Edit. Reverte.
- 46) Larry T. Taylor et al, Supercritical Fluid extraction / Chromatography / Fractionation. Shortcourse May 10-13, 1993.
- 47) M. L. Lee and K. E. Maykides (Eds.), Analytical Supercritical Fluid Chromatography and Extraction, Chromatography Conferences, Inc. (1990)
- 48) R. S. Dillon, F.A.C.P., Endocrinología. Manual Moderno, México (1976) 301-308 del capítulo 9.
- 49) Labhart, Endocrinología clínica, Salvat Editores S.A. (1990) 443-446 del capítulo 8.
- 50) D. R. Knapp, Handbook of Analytical Derivatization Reactions, A Wiley-Interscience Publication, John Wiley & Sons (1979) 104-144 del capítulo 2.