

Evaluación del desempeño del método de inyección en flujo multijeringa para la preconcentración de Fe III con quitina cubana

Evaluation of the performance of the multi-syringe flow injection method for Fe III preconcentration with Cuban chitin

Yania Suárez Pérez^{1*} 

¹Universidad de La Habana, Instituto de Farmacia y Alimentos. La Habana, Cuba.

*Autor para la correspondencia:
yaniasp@ifal.uh.cu

Artículo original

Recibido: 28/07/2024

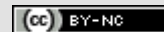
Aceptado: 02/08/2024

Cómo citar

Suárez Pérez Y. Evaluación del desempeño del método de inyección en flujo multijeringa para la preconcentración de Fe III con quitina cubana. Revista de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias. 2024;7(2):e9970



Acceso abierto



Licencia Creative Commons 4.0.
No comercial

ISSN 2411-927X

RESUMEN

Introducción. Los sistemas de análisis en flujo presentan amplias ventajas. Se desarrolló una técnica de inyección en flujo multijeringa, con preconcentración en discos quelantes para el análisis de Fe III en agua. Las propiedades y disponibilidad de la quitina cubana conllevaron a evaluar su uso como relleno en extracción en fase sólida para futuras aplicaciones de preconcentración en línea.

Objetivo. Evaluar el desempeño del método de inyección en flujo multijeringa para la preconcentración de Fe III con el empleo de quitina cubana.

Métodos. Se adaptó el sistema de inyección en flujo multijeringa, desarrollado por el grupo de Química Analítica y Medioambiental de la Universidad de las Islas Baleares. Se sustituyeron los discos por una columna de metacrilato rellena con quitina cubana. Este polímero se introdujo para la preconcentración de Fe III en soluciones acuosas. Se utilizó como detector un espectrofotómetro de diodos y HCl 2 mol/L como eluyente. Se basó en la cuantificación del compuesto coloreado entre tiocianato de amonio y el analito. Se evaluó el desempeño del método debido a que se realizaron modificaciones menores.

Resultados. El método fue lineal en el rango de 2,5 a 7,5 ppm, además lo suficientemente preciso y exacto según los criterios establecidos.

Conclusiones. El empleo del método evaluado fue capaz de emitir con exactitud los valores de recobrado al usar la preconcentración del analito en la columna de menor d.i, por lo que se demostró de forma preliminar la capacidad de la quitina para retener Fe III y la validez del método adaptado.

Palabras clave: sistema de inyección en flujo multijeringa; validación; hierro; quitina.

ABSTRACT

Introduction. Flow analysis systems offer many advantages. A multi-syringe flow injection technique was developed, with preconcentration in chelating disks for the analysis of Fe III in water. The properties and availability of Cuban chitin led to the evaluation of its use as a packing in solid phase extraction for future applications of on-line preconcentration.

Objective. To evaluate the performance of the multi-syringe flow injection method for the preconcentration of Fe III using Cuban chitin.

Methods. The multi-syringe flow injection system, developed by the Analytical and Environmental Chemistry group of the University of the Balearic Islands, was adapted. The disks were replaced by a methacrylate column filled with Cuban chitin. This polymer was introduced for the preconcentration of Fe III in aqueous solutions. A diode array spectrophotometer was used as a detector and 2 mol/L HCl as the eluent. It was based on the quantification of the colored compound between ammonium thiocyanate and the analyte. The performance of the method was evaluated because minor modifications were made.

Results. The method was linear in the range of 2.5 to 7.5 ppm, and was sufficiently precise and accurate according to the established criteria.

Conclusions. The use of the evaluated method was able to accurately emit the recovery values when using the preconcentration of the analyte in the column with the lowest i.d., thus preliminarily demonstrating the capacity of chitin to retain Fe III and the validity of the adapted method.

Keywords: multi-syringe flow injection system; validation; iron; chitin.

Introducción

Con el avance científico-técnico los analistas deben enfrentar más retos, pues necesitan desarrollar nuevos métodos que sean lo suficientemente selectivos, sensibles, que consuman mínimas cantidades de muestra y de reactivos, que posean elevada frecuencia de análisis con un costo relativamente bajo y que sean respetuosos con el medioambiente. En este marco se destacan los métodos automatizados y, en especial, el análisis en flujo.

Las técnicas de análisis en flujo han sido los métodos automáticos de análisis que han despertado mayor interés, desde la aparición del análisis en flujo segmentado (SFA) propuesto por Skeggs en 1957. Su evolución hasta la actualidad ha permitido la introducción de técnicas por inyección en flujo multijeringa (MSFIA, por sus siglas en inglés, *multi-syringe flow injection system*) introducido en 1999 por el grupo de Química Analítica y Medioambiental de la Universidad de las Islas Baleares y los sistemas multibomba en el 2002.⁽¹⁾

Las técnicas por MSFIA reúnen las ventajas de los métodos de flujo anteriores y evitan sus principales inconvenientes. Además, es posible mejorar la sensibilidad en aplicaciones que así lo requieran mediante procedimientos en línea como son los métodos de separación y preconcentración.

La cuantificación de Fe III en muestras de agua constituye un tema de gran interés,⁽²⁾ pero si se tiene en cuenta la baja concentración del analito en esta matriz es conveniente su preconcentración previa a la etapa de cuantificación, para lo cual se desarrolló un método por MSFIA.⁽³⁾

La capacidad de la quitina y la quitosana para remover iones metálicos en solución ha sido ampliamente demostrada en diferentes estudios.^(4,5,6,7,8,9)

Pons y otros⁽¹⁰⁾ desarrollaron un método por MSFIA para la determinación de Fe en muestras de agua usando discos quelantes. En el presente trabajo se propone el uso de quitina cubana como relleno en extracción en fase sólida para la cuantificación de Fe III en solución, para su posterior aplicación en diferentes estudios cinéticos en que se evalúe la capacidad de retención de este analito en procedimientos de preconcentración en línea.

Al realizar modificaciones en las condiciones experimentales, en particular, el medio filtrante y el caudal, es preciso comprobar que el desempeño del método es adecuado para el uso previsto.^(11,12,13) Teniendo en cuenta estos antecedentes. El objetivo fue evaluar el desempeño del método MSFIA para la preconcentración de Fe III con el empleo de quitina cubana.

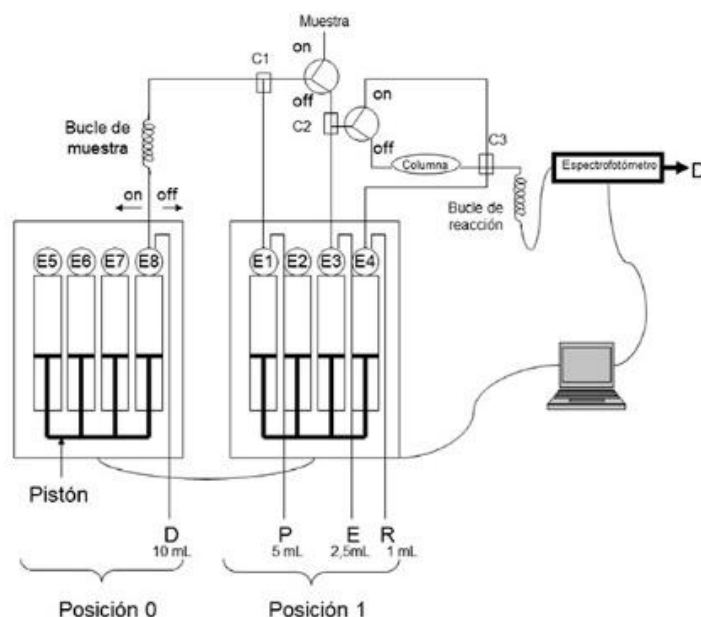
Métodos

Se adaptó el método por MSFIA desarrollado por *Pons* y otros, 2004⁽¹⁰⁾ el cual está conformado por dos buretas multijeringa de caudal programable (micro Bu 2030, CRISON, Alella, Barcelona, España). Cada jeringa tenía en su cabeza una válvula solenoide (E) de tres vías (N-Research Caldwell NJ, Estados Unidos de América). Uno de los módulos tenía dos válvulas solenoides de tres vías adicionales V_1 y V_2 (N-Research Caldwell NJ, Estados Unidos de América). El detector fue espectrofotométrico de Diodos PC 2000 A/D (Ocean Optics, Dunedin, Florida, Estados Unidos de América) conectado a una de las ranuras de la computadora (PC).

La fuente luminosa contaba con una lámpara de deuterio y una de halógeno (Top Sensor System, Holanda). La luz de la cubeta de flujo fue de 18 μ L de volumen interno y 1 cm de paso óptico a través de una fibra

óptica de 400 μm de diámetro. Otra fibra óptica del mismo diámetro transmitió la radiación de la cubeta al detector. Todos los tubos del sistema fueron de PTFE de 0,8 mm de diámetro interno, excepto el tubo del bucle que fue de 1,5 mm de diámetro interno. La posición *off* de las válvulas (solenoide desactivado) conectó las jeringas al caudal derecho y la posición *on* al izquierdo.

En la figura se representa esquemáticamente el sistema propuesto para la determinación de Fe III para procedimientos sin y con preconcentración.



Fuente: Adaptado de Pons y otros, 2004.⁽¹⁰⁾

Fig. - Esquema del sistema de inyección de flujo multijeringa (MSFIA) propuesto para la determinación de Fe III. (D: Desagüe, P: Portador, E: Eluyente, R: Reactivo, V_1 y V_2 : válvulas de conmutación, E_1 - E_8 : válvulas solenoides y C_1 - C_3 : uniones "T").

El módulo 1 se conectó directamente a la PC e incluyó tres jeringas:

- jeringa 1 (P): Volumen 5 mL, contenía al portador (agua purificada por sistema Millipore);
- jeringa 3 (E): Volumen 2,5 mL, contenía al eluyente (solución de HCl 2 mol/L);
- jeringa 4 (R): Volumen 1 mL, contenía al reactivo cromogénico (tiocianato amónico 1,25 mol/L).

El módulo 2 estuvo constituido por jeringas de 10 mL y se empleó una de ellas para la muestra (E_8). Se utilizó un bucle de reacción anudado de 215 cm y un caudal para la técnica sin preconcentración de 5mL/min y de 4mL/min para la técnica con preconcentración.

Se preparó una disolución madre de Fe III 100 mg/mL, pesando 0,863 g de sulfato férrico amónico dodecahidratado (Scharlau extra puro) en 10 mL de HCl y posteriormente se completó a volumen de 1 L con agua purificada con sistema Millipore.

Preparación de las muestras: Se prepararon diferentes diluciones de la solución madre en tampón fórmico-formiato pH 2,5-3 de concentración 1 mol/L para obtener soluciones de concentración 2,5; 3,75; 5; 6,25 y 7,5 ppm.

Procedimiento sin preconcentración: Se utilizó un procedimiento elaborado en el *software* AUTOANALYSIS que constó de los siguientes pasos:

1. Dispensar 2 mL de muestra E_8 (módulo 0) a 5 mL/ min con la válvula V_1 en posición *off* y V_2 en posición *on*.

2. Cargar 2 mL de muestra E₈ (módulo 0) a 5 mL/ min con la válvula V₁ en posición *on* y la V₂ en posición *off*.
3. Esperar un segundo.
4. Registrar el espectro UV cada 0,7 seg utilizando como λ máxima = 469 nm y $\lambda = 650$ nm como corrección.
5. Dispensar 0,3 mL de muestra E₈ (módulo 0) a 5 mL/min con la válvula V₁ en posición *off* y la V₂ en posición *on*.
6. Dispensar 2,5 mL (módulo 1) a 5 mL/min con las válvulas E₁ (portador) y E₄ (reactivo) en posición *on*.
7. Cargar 2,5 mL a 5 mL/min (Módulo 1) con todas las válvulas E₁ (portador), E₃ (eluyente) y E₄ (reactivo) en posición *off*.
8. Detener la lectura
9. Repetir tres veces el procedimiento.

Procedimiento con preconcentración: Se prepararon columnas de metacrilato de forma cilíndrica construidas en el laboratorio con 3 y 4 mm de diámetro interno (d.i.) y 40 mm de longitud. Se utilizó como relleno quitina cubana de calidad farmacéutica suministrada por la Empresa Laboratorio Mario Muñoz. En uno de los extremos se colocó una frita de polietileno de diámetro medio de poro de 90 μ m. Se preconcentraron por triplicado 3 mL de muestra equivalente al 100 % (5 ppm).

Se utilizó el mismo sistema incluyendo nuevos pasos en el procedimiento destinados a acondicionar la columna antes de cada análisis (dispensar portador y eluyente a través de la columna) y elusión del analito después de la etapa de preconcentración utilizando diferentes volúmenes de HCL 2 mol/L. Se calculó en cada análisis el % de recuperación de analito respecto al % obtenido sin preconcentración.

Se realizó la evaluación del desempeño del sistema a través de los siguientes parámetros:

- Linealidad: Se construyó una curva de calibración de área bajo la curva vs. concentración de analito en %, se utilizaron cinco niveles de concentración con seis réplicas cada uno en el rango de 50-150 % de la cantidad teórica declarada: 5 pmm. Los resultados se procesaron por regresión lineal empleando el programa ESTATISTICA versión 6,01. Se determinaron los parámetros establecidos: r (coeficiente de correlación lineal), r^2 (coeficiente de determinación), a (intercepto) y b (pendiente), para el 95 % de confianza y se compararon con los criterios de aceptación.⁽¹¹⁾
- Exactitud: Se analizaron por triplicado muestras equivalentes al 75, 100, 125 %. Se determinó el CV por cada punto y además el CV total. Se construyó una curva de recuperación de % recuperado (Y) vs. % añadido (X). Los resultados se procesaron estadísticamente de igual forma que la curva de calibración de la linealidad del sistema. Además, se calculó el porcentaje de recobro (\mathcal{R}) y el recobrado medio ($\overline{\mathcal{R}}$). Se aplicó la prueba t de Student para demostrar que no existían diferencias significativas entre el valor medio de recobro obtenido y el 100 %, siendo: $n-1$ los grados de libertad y $\alpha = 0,05$.

Por último, se realizó la prueba G de Cochran, para determinar si el factor concentración tuvo alguna influencia en los resultados. El valor de $G_{\epsilon\psi}$ se calculó mediante la siguiente expresión:

$$G_{exp} = \frac{S_{max}^2}{S_1^2 + S_2^2 + S_3^2}$$

donde S_{max} es desviación estándar máxima; $S_{1,2,3}$ es desviación estándar del nivel 1, 2 y 3.

Se comparó con G tabulada (G_{tab}) para $\alpha = 0,05$; k (grupos experimentales) = 3 y n (determinaciones por grupo) = 3 con la G_{exp} . Si $G_{exp} < G_{tab}$ las varianzas de las tres concentraciones fueron equivalentes, es decir, el factor concentración no influyó en la variabilidad de los resultados.

- Precisión: Se evaluó a través de la repetibilidad a tres niveles, utilizando los mismos resultados del estudio de exactitud (con preconcentración) y al 100 % (sin preconcentración). En este último caso el análisis se realizó por sextuplicado (repetibilidad de la respuesta analítica). Se calculó el coeficiente de variación (CV) y se comparó con el criterio de aceptación.⁽¹¹⁾
- Especificidad: Se determinó por triplicado la respuesta del blanco, constituido por tampón fórmico- formiato pH 2,5-3, utilizando agua purificada con sistema Millipore como ensayo de corrección. Se descartó la aparición de respuesta analítica en el rango analizado (400-800 nm), a través del análisis de los espectros de absorción.
- Rango: Se estableció el intervalo en que se cumplieron los criterios de linealidad, exactitud y repetibilidad del método.⁽¹¹⁾

Resultados

En la tabla se resumen los resultados al utilizar disoluciones de concentración conocida.

Tabla - Resumen de los resultados de la evaluación del desempeño del método

| Parámetro | Resultados | Criterio de aceptación |
|---|--|---|
| Linealidad del método | $Y = 0,4303 X - 0,1782$ $r = 0,9906$ $r^2 = 0,9804$ $t_{exp} = -1,4248$ $p = 0,17$ $b = 0,43$ $t = 36,49 ; p = 0,00$ | $Y = bx + a$ $r \geq 0,99$ $r^2 \geq 0,98$ Intercepto no significativo ($\alpha = 0,05, n=30$) $t_{exp} < t_{tab}(2,05)$ $p \geq 0,05$ $b \cong 1$ t alta; $p \leq 0,05$ |
| Exactitud | $Y = 0,9913X - 1,3240$ $r = 0,9989$ $r^2 = 0,9978$ $t_{exp} = -0,9889$ $p = 0,35$ $b = 0,99$ $t = 78,48; p = 0,00$ | $Y = bx + a$ $r \geq 0,99$ $r^2 \geq 0,98$ Intercepto no significativo ($\alpha = 0,05; n=13$); $t_{exp} < t_{tab}(2,16)$ $p \geq 0,05$ $b \cong 1$ t alta; $p \leq 0,05$ |
| | $R_{total} = 97,38 \%$ $CV_{total} = 2,72 \%$ | $R_{total} = 97-103 \%$ $CV_{total} \leq 3,0 \%$ |
| | $G_{exp} = 0,7545$ $G_{tab} = 0,8709$ | Test de Cochran $G_{exp} < G_{tab} (\alpha = 0,05; k=3; n=3)$ |
| | $t_{exp}(2,3722) < t_{tab}$ | Test t Student $t_{exp} < t_{tab}(12,71)$ |
| Repetibilidad del método | $CV_{75\%} = 0,62 \%$ $CV_{100\%} = 1,36 \%$ $CV_{125\%} = 1,18 \%$ | $CV \leq 2,0 \%$ |
| Repetibilidad de la respuesta analítica | $CV_{100\%} = 1,29 \%$ | |

La preconcentración de analito a través de su paso por la columna, provocó retención de Fe III que se eluyó con HCl 2 mol/L. Se presentaron sobrepresiones en el sistema, que condujeron a la disminución del caudal. Los resultados en la evaluación de los recobrados de Fe III preconcentrados en línea fueron de $74,45 \pm 0,52 \%$ para d.i. de 3 mm y de $89,22 \pm 0,48 \%$ para 4 mm de d.i., respecto al procedimiento realizado en iguales condiciones sin preconcentración.

Discusión

El sistema diseñado por *Pons* y otros, 2004⁽¹⁰⁾ de inyección en flujo multijeringa permitió la determinación de Fe III sin y con preconcentración. Fue preciso utilizar el programa de instrucciones confeccionado para cada objetivo, a través del programa AUTOANALYSIS. Se obtuvieron señales adecuadas, atribuibles a la formación del complejo coloreado entre el analito y el tiocianato de amonio, que absorbió a una λ máxima de 469 nm en las condiciones establecidas previamente por *Pons*, 2004.⁽¹⁰⁾ Sin embargo, la utilización de columnas en línea provocó sobrepresiones en el sistema, en las condiciones recomendadas,⁽¹⁰⁾ lo cual conllevó a la reducción del caudal a 4 mL/min y a un incremento en el tiempo de análisis, ambos se consideran cambios menores en las condiciones experimentales.

Se recomienda continuar los estudios utilizando la columna de mayor d.i., ya que se obtuvieron menores CV en la respuesta analítica, fue posible realizar mayor cantidad de análisis en un mismo intervalo de tiempo y se alcanzaron los mejores recobrados.

El sistema fue lineal en el rango analizado, demostrando la elevada proporcionalidad entre el área bajo la curva y la concentración de Fe III. Se cumplieron satisfactoriamente todos los criterios establecidos para r , r^2 , así como para el intercepto (que no fue diferente significativamente de cero) y la pendiente (fue significativa). El CV de los factores respuesta dio 3,65 %, inferior al 5 % establecido como límite.⁽¹¹⁾

La exactitud cumplió los parámetros de la regresión lineal, a partir de los nueve puntos experimentales procesados por la curva de recuperación (% obtenido vs. % añadido). El recobrado medio no fue diferente desde el punto de vista estadístico del 100 %, según los resultados con la prueba

de *t* de Student, por lo que los resultados experimentales no se diferenciaron apreciablemente de los valores reales.

El método presentó adecuada repetibilidad ($CV < 2 \%$), por lo que, en condiciones similares de operación, analista; día y laboratorio, los errores aleatorios no influyeron significativamente en la respuesta analítica. Teniendo en cuenta que el método se evaluó en el mismo laboratorio y equipo de medición propuesto por *Pons* y otros, 2004.⁽¹⁰⁾ Solo se consideró relevante el efecto del analista durante la evaluación del desempeño, tal como se recomienda ante el uso de métodos previamente validados.⁽¹¹⁾

Las evaluaciones de los blancos por triplicado dieron líneas bases de absorbancia nula en todo el rango estudiado, por lo que el método fue específico para el Fe III. En aras de garantizar la calidad de los resultados y debido a la elevada sensibilidad del método,⁽¹⁰⁾ resultó de gran importancia trabajar con agua purificada por sistema Millipore y reactivos de alta pureza para evitar interferencias en la determinación.

A partir de la evaluación realizada del desempeño se pudo afirmar que el método evaluado por MSFIA resultó específico, lineal, exacto y repetible para la cuantificación de trazas de Fe III en soluciones acuosas con preconcentración. A su vez, se demostró de forma preliminar, la capacidad de la quitina cubana (utilizada como relleno de columnas de metacrilato) para retener Fe III, y la del método para emitir con exactitud los valores de recobrado al usar la preconcentración del analito en la columna de menor d.i.

Agradecimientos

Se agradece la ayuda al financiamiento otorgado al Proyecto CTQ2001-01201 del Plan Nacional de Ciencias y Tecnologías Química, Universidad

de las Islas Baleares, Palma de Mallorca, España y a los miembros del laboratorio de Química Analítica de la Facultad de Ciencias, en especial a la Dr.C. María del Carmen Pons y al Dr.C. Víctor Cerdà.

Referencias bibliográficas

1. Cerdà V. Introducción a los métodos de análisis en flujo. Cap I. 1 ed. Palma de Mallorca: SCWARE S.L; 2006. p. 20-31.
2. Pons C, Forteza R, Cerdà V. The use of anion-exchange disks in an optrode coupled to a multi-syringe flow-injection system for the determination and speciation analysis of iron in natural water samples. *Talanta*. Elsevier. 2005;66(1):210-7. DOI: [10.1016/j.talanta.2004.11.009](https://doi.org/10.1016/j.talanta.2004.11.009)
3. Pons C, Miró M, Becerra E, Estela JM, Cerdà V. An intelligent flow analyser for the in-line concentration, speciation and monitoring of metals at trace levels. *Talanta*. Elsevier. 2004;62(5). DOI: [10.1016/j.talanta.2003.10.014](https://doi.org/10.1016/j.talanta.2003.10.014)
4. De Oliveira L, De Cássia R, Maia AL, Porto F, Sacconi A, Kazutaka F, et al. Heavy metal biosorption by chitin and chitosan isolated from *Cunninghamella elegans* (IFM 46109). *Brazilian Journal of Microbiology*. 2004;35(3). DOI: [10.1590/S1517-83822004000200013](https://doi.org/10.1590/S1517-83822004000200013)
5. Taboada E, Cabrera G, Cárdenas G. Retention capacity of chitosan for copper and mercury ions. *Journal of the Chilean Chemical Society*. 2003;48(1). DOI: [10.4067/S0717-97072003000100002](https://doi.org/10.4067/S0717-97072003000100002)
6. Xie Q, Liang G, Lin T, Chen F, Wang D, Yang B. Selective chelating precipitation of palladium metal from electroplating wastewater using chitosan and its derivative. *Adsorpt. Sci. Technol*. 2020;38:113-26 DOI: [10.1177/0263617420918729](https://doi.org/10.1177/0263617420918729)

7. Xiaohui W, Yumin D, Lihoung F, Hui L, Ying H. Chitosan–metal complexes as antimicrobial agent: syntesis, characterization and structure- activity study. *Polymer Bulletin*. 2005;55:105-13. DOI: [10.1007%2Fs00289-005-0414-1](https://doi.org/10.1007%2Fs00289-005-0414-1)
 8. Varma AJ, Deshpande SV, Kennedy JF. Metal complexation by chitosan and its derivatives: a review. *Carbohydrate Polymers*. 2004;55:77-93. DOI: [10.1016/j.carbpol.2003.08.005](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2003.08.005)
 9. Issahaku I, Tetteh IK, Tetteh AY. Chitosan and chitosan derivatives: Recent advancements in production and applications in environmental remediation. *Environmental Advances* 2023;11(100351) DOI: [10.1016/j.envadv.2023.100351](https://doi.org/10.1016/j.envadv.2023.100351)
 10. Pons C, Forteza R, Cerdà V. Expert multi-syringe flow-injection system for the determination and speciation analysis of iron using chelating disks in water samples. *Analytical Chimica Acta*. 2004;524(1-2):79-88. DOI: [10.1016/j.aca.2004.01.011](https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.01.011)
 11. Eurolab España. Guía Eurachem: La adecuación al uso de los métodos analíticos – Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados. 1ª ed. España: Morillas y col. Eds.; 2016 [acceso 23/07/2024]. p. 40. Disponible en: https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_ES.pdf
 12. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals For Human Use. ICH Harmonised Guideline. Validation of Analytical Procedures Q2(R2); 2022. [acceso 23/07/2024]. Disponible en: https://database.ich.org/sites/default/files/ICH_Q2-R2_Document_Step2_Guideline_2022_0324.pdf
 13. EMA. European Medicines Agency. ICH Q2(R2) Validation of analytical procedures-Scientific guideline. Unión Eyropea; 2024 [acceso
-

22/07/2024]. Disponible en: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-q2r2-validation-analytical-procedures-scientific-guideline>

Conflicto de intereses

La autora declara que no existe conflicto de intereses.

Financiación

Proyecto CTQ2001-01201 del Plan Nacional de Ciencias y Tecnologías Química, Universidad de las Islas Baleares, Palma de Mallorca, España.