

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Depositado en Depto. Química Analítica
de la Facultad de Química
de esta Universidad desde el día 27-Julio-99
hasta el día 16-Sept-1999

Sevilla 27 de Julio de 1999
EL DIRECTOR DE Depto. Q. Analítica

1235218

R.M.063

+ / 735

ESTUDIO ELECTROQUÍMICO DE ANESTÉSICOS LOCALES:
DIBUCAÍNA, PRILOCAÍNA Y LIDOCAÍNA.

POR

MARÍA SAN MARTÍN FERNÁNDEZ-MARCOTE

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
SECRETARÍA GENERAL

Queda registrada esta Tesis Doctoral
al folio 172 número 36 del libro
correspondiente. 21 JUL. 1999

Sevilla,

El Jefe del Negociado de Tesis,

PD. A. J. [Signature]

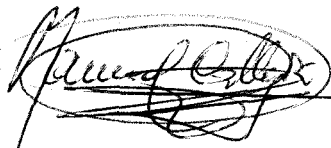
SEVILLA 1999

ESTUDIO ELECTROQUÍMICO DE ANESTÉSICOS LOCALES:
DIBUCAÍNA, PRILOCAÍNA Y DIBUCAÍNA.

por

MARÍA SAN MARTÍN FERNÁNDEZ MARCOTE

El Director



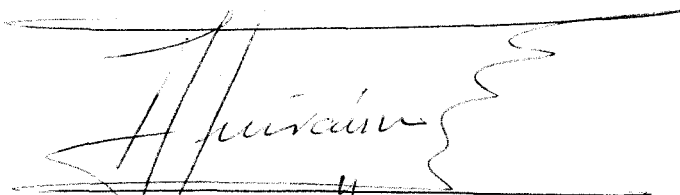
D. Manuel Callejón Mochón, Profesor Titular del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Sevilla.

El Director



D. Juan Carlos Jiménez Sánchez, Profesor Titular del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Sevilla.

El Director



D. Alfonso Guiraum Pérez, Catedrático del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Sevilla.

Memoria presentada para optar al grado de Doctor en Ciencias Químicas por María San Martín Fernández-Marcote.



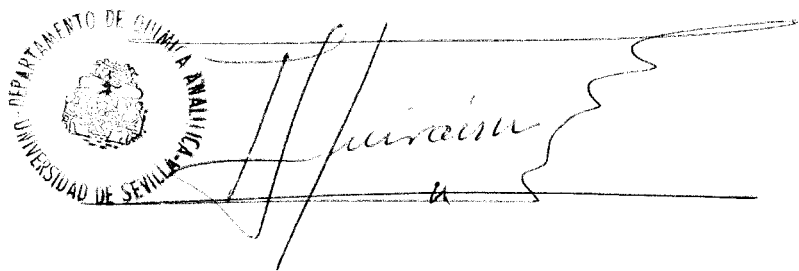
ALFONSO GUIRAUM PEREZ, CATEDRÁTICO DE QUÍMICA ANALÍTICA, Y DIRECTOR DEL
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA

CERTIFICA: Que el presente trabajo de investigación titulado

"ESTUDIO ELECTROQUÍMICO DE ANESTÉSICOS LOCALES:
DIBUCAÍNA, PRILOCAÍNA Y DIBUCAÍNA"

constituye la Memoria de Investigación que presenta Doña María San Martín Fenández-Marcote, para aspirar al grado de Doctor en Ciencias Químicas y ha sido realizado íntegramente en los laboratorios del Departamento de Química Analítica de esta Universidad, bajo la dirección de los Profesores Titulares Callejón Mochón y Jiménez Sánchez, y la mía propia.

Y para que conste, expido y firmo la presente, en Sevilla a 10 de julio de 1999.



The image shows a circular official stamp of the Department of Analytical Chemistry at the University of Seville. The text around the perimeter of the stamp reads "DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA" at the top and "UNIVERSIDAD DE SEVILLA" at the bottom. In the center of the stamp is a small emblem. Overlaid on the stamp is a handwritten signature in black ink, which appears to be "Guiraum".

Fdo: Alfonso Guiraum Pérez

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que han participado en la consecución de este Trabajo, y especialmente:

- A los Directores de este Trabajo por su constante estímulo, comprensión, paciencia y ayuda,
- Al Director del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Sevilla por haberme permitido realizar este Trabajo, y facilitarme todos los medios materiales a su disposición,
- A todo el personal docente y no docente del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Sevilla, por su amabilidad,
- Al profesor Miguel Ángel Bello por la comprensión y paciencia mostrada por el uso de su equipo informático,
- Al profesor Fernando de Pablos por la ayuda prestada en el uso de las técnicas de espectrometría UV-visible y HPLC,
- A mis compañeros de laboratorio y especialmente a Luis, Esteban y Antonio José por todos estos años de ayuda y apoyo,
- A mis compañeros y amigos Patricia, Inmaculada, Juan Carlos, Marta, Enrique, Vicente, Juan Luis, por haber compartido duros y felices momentos,
- A Miguel por su valiosa ayuda y empuje recibidos en los momentos de más desánimo,
- Al "Sector Crítico", por ser fuente de mejora constante, y
- A mi familia por darme fuerzas para continuar,

A mis padres

FE DE ERRATAS

Pagina/ línea	Donde dice:	Debe decir:
7/ 16	y acoplado al. ordenador	y acoplado a un ordenador
16/ 15	al pivote alifático central	al puente alifático central
28/ 13	con benceno/metano/ácido anhídrido	con benceno/metanol/ácido anhídrido
31/ 5	metano/H ₂ O/H ₃ PO ₄ /hexilamina	metanol/ H ₂ O/H ₃ PO ₄ /hexilamina
121/ tab. 3.13.1	Relación especie extraña/dibucaína	Relación especie extraña/dibucaína límite de no interferencia.
127/ 12	A 0.5 ml de solución metanólica de 10 ⁻⁴ M	A 2.5 ml de solución metanólica de 10 ⁻³ M
141/ 1	A medida que aumenta el tiempo de goteo.	A medida que aumenta el tiempo de goteo aumenta la intensidad de pico.
146/ 2	clorhidrato de prilocaína 10 ⁻³ m	clorhidrato de prilocaína 10 ⁻³ M
155/ 2	potenciales de pico y de onda media	potenciales de pico y de medio pico
156/ tab. 4.12.3.2	E _{1/2}	E _{p1/2}
160/ 3	de 3.8 que podría aproximarse a 2	de 1.8 que podría aproximarse a 2
165/tab. 4.19.1.	Relación especie extraña/prilocaína	Relación especie extraña/prilocaína límite de no interferencia.
175/ 2	la experiencias exteriores	las experiencias posteriores
176/ 1	cantidades de hidróxido sódico	cantidades de hidróxido potásico
183/ tab. 5.7.1.	-I _p	I _p
197/ 9	E _{1/2}	E _{p1/2}
197/ ecuación	E _{1/2}	E _{p1/2}
197/ tab. 5.10.3.2.	E _{1/2}	E _{p1/2}
206/ tab. 5.17.1.	Relación especie extraña/ lidocaína	Relación especie extraña/ lidocaína límite de no interferencia.
214/ 4	sobre el electrodo rotatorio de pasta	sobre el electrodo de pasta
214/ 10	La velocidad de rotación es 3000 rpm	La velocidad de rotación es 0 rpm
225/ 2	E _{1/2}	E _{p1/2}
230/ 11	concentración 10 ⁻⁵ M	concentración 10 ⁻⁴ M
231/ 3	velocidad de rotación de 200 rpm, una velocidad de barrido de 1.5 mV/s	velocidad de rotación de 2000 rpm, una velocidad de barrido de 5.1 mV/s
244/ 2	E _{1/2}	E _{p1/2}
244/ tab. 6.2.6.2.2.	E _{1/2}	E _{p1/2}
246/ 4	27.08 y 2.5 µg ml	27.08 y 2.5 µg/ml

OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	1
1. INSTRUMENTACIÓN Y REACTIVOS	5
1.1. REACTIVOS	7
1.2. INSTRUMENTACIÓN.....	7
2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS	9
2.1. ANESTÉSICOS LOCALES.....	11
2.1.1. <i>DIBUCAÍNA</i>	17
2.1.2. <i>PRILOCAÍNA</i>	17
2.1.3. <i>LIDOCAÍNA</i>	18
2.2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS SOBRE LOS MÉTODOS DE ANÁLISIS DE LOS ANESTÉSICOS LOCALES OBJETO DE ESTUDIO	20
2.2.1. <i>DIBUCAÍNA</i>	20
2.2.2. <i>PRILOCAÍNA</i>	23
2.2.3. <i>LIDOCAÍNA</i>	25
2.2.4. <i>DIBUCAÍNA Y LIDOCAÍNA</i>	46
2.2.5. <i>PRILOCAÍNA Y LIDOCAÍNA</i>	48
2.3. TÉCNICAS ELECTROANALÍTICAS UTILIZADAS EN ESTA MEMORIA.....	49
2.3.1 <i>INFLUENCIA DEL pH</i>	50
2.3.2. <i>TIPOS DE CORRIENTES EN POLAROGRAFÍA</i>	53
2.3.2.1. CORRIENTE FARADAICA.....	54
2.3.2.2. CORRIENTE CAPACITATIVA	59
2.3.3. <i>CARACTERIZACIÓN DE LOS DIFERENTES TIPOS DE PROCESOS ELECTRÓDICOS</i>	61
2.3.4. <i>CRITERIOS DE REVERSIBILIDAD DEL PROCESO POLAROGRÁFICO</i>	64
2.3.4.1. ESTUDIO DE LA REVERSIBILIDAD DE LOS PROCESOS MEDIANTE POLAROGRAFÍA TAST	65
2.3.4.2. ESTUDIO DE REVERSIBILIDAD MEDIANTE PPD.	67
2.3.4.3. ESTUDIO DE LA REVERSIBILIDAD MEDIANTE VOLTAMPEROMETRÍA CÍCLICA Y DE BARRIDO LINEAL.....	69
2.3.5. <i>DETERMINACIÓN DEL COEFICIENTE DE DIFUSIÓN DE LA ESPECIE ELECTROACTIVA</i>	73
2.3.6. <i>DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE ELECTRONES TRANSFERIDOS EN LA REACCIÓN ELECTRÓDICA</i>	74

3. ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO POLAROGRÁFICO Y DETERMINACIÓN DE DIBUCAÍNA POR POLAROGRAFÍA DIFERENCIAL DE PULSO.	77
3.1. INFLUENCIA DEL PH.	80
3.2. INFLUENCIA DEL TIEMPO DE GOTEÓ.....	84
3.3. INFLUENCIA DE LA ALTURA DEL DEPÓSITO DE MERCURIO SOBRE LA INTENSIDAD DE LA ONDA POLAROGRÁFICA.	87
3.4. INFLUENCIA DE LA AMPLITUD DE PULSO APLICADO.	91
3.5. INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA.....	94
3.6 ESTUDIO DE LA REVERSIBILIDAD.	97
3.6.1 ESTUDIO DE LA REVERSIBILIDAD MEDIANTE TAST.....	97
3.6.2. ESTUDIO DE LA REVERSIBILIDAD MEDIANTE PPD.	100
3.6.3. ESTUDIO DE LA REVERSIBILIDAD MEDIANTE VOLTAMPEROMETRÍA CÍCLICA.....	107
3.7 DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE ELECTRONES.....	110
3.8. MECANISMO DE REDUCCIÓN DE LA DIBUCAÍNA.	112
3.9. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN.	114
3.10. PROCEDIMIENTO RECOMENDADO PARA LA DETERMINACIÓN DE DIBUCAÍNA.	116
3.11. REPRODUCIBILIDAD Y SEGURIDAD DEL MÉTODO.	117
3.12. ESTUDIO DE LOS LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN.....	118
3.13. ESTUDIO DE INTERFERENCIAS.....	121
3.14. APLICACIONES.....	122
4. ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO POLAROGRÁFICO DE LA NITROSAMINA DE LA PRILOCAÍNA. DETERMINACIÓN DE PRILOCAÍNA POR POLAROGRAFÍA DIFERENCIAL DE PULSO.....	125
4.1. INFLUENCIA DE LA CANTIDAD DE ÁCIDO FOSFÓRICO EN LA ETAPA DE NITROSACIÓN.	129
4.2. INFLUENCIA DE LA CANTIDAD DE NITRITO SÓDICO EMPLEADO EN EL PASO DE NITROSACIÓN.....	130
4.3. INFLUENCIA DE LA CANTIDAD DE METANOL EN EL PASO DE NITROSACIÓN.	132
4.4. INFLUENCIA DE LA VELOCIDAD DE ADICIÓN DEL ÁCIDO FOSFÓRICO DURANTE LA ETAPA DE NITROSACIÓN.	133

4.5. INFLUENCIA DEL TIEMPO DE PASO DE NITRÓGENO DURANTE LA REACCIÓN DE NITROSACIÓN.	135
4.6. INFLUENCIA DEL PH.	136
4.7. INFLUENCIA DEL TAMAÑO DE GOTA DE MERCURIO.	139
4.8. INFLUENCIA DEL TIEMPO DE GOTEÓ.....	140
4.9. INFLUENCIA DE LA AMPLITUD DE PULSO APLICADO.	141
4.10. INFLUENCIA DE LA VELOCIDAD DE BARRIDO.....	143
4.11. INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA.....	144
4.12. ESTUDIO DE LA REVERSIBILIDAD	145
4.12.1. ESTUDIO DE LA REVERSIBILIDAD DE LOS PROCESOS MEDIANTE TAST.....	145
4.12.2. ESTUDIO DE LA REVERSIBILIDAD DE LOS PROCESOS MEDIANTE PPD.....	147
4.12.3. ESTUDIO DE LA REVERSIBILIDAD MEDIANTE VOLTAMETRÍA CÍCLICA.....	153
4.13. DETERMINACIÓN DEL COEFICIENTE DE DIFUSIÓN Y DEL NÚMERO DE ELECTRONES.....	156
4.14. MECANISMO DE REDUCCIÓN DE LA N-NITROSAMINA DERIVADA DE LA PRILOCAÍNA.....	159
4.15. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN.	160
4.16. PROCEDIMIENTO RECOMENDADO EN LA DETERMINACIÓN DE PRILOCAÍNA.....	162
4.17. REPRODUCIBILIDAD Y SEGURIDAD DEL MÉTODO.....	163
4.18. ESTUDIO DE LOS LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN.....	163
4.19. ESTUDIO DE INTERFERENCIAS.....	165
4.20. APLICACIONES.....	166
5. ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO POLAROGRÁFICO DEL PRODUCTO DE OXIDACIÓN DE LA LIDOCAÍNA EN AGUA OXIGENADA. DETERMINACIÓN DE LIDOCAÍNA POR POLAROGRAFÍA DIFERENCIAL DE PULSO.....	169
5.1. INFLUENCIA DE LA CANTIDAD DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO AÑADIDO EN LA REACCIÓN DE OXIDACIÓN.....	173
5.2. INFLUENCIA DE LA CANTIDAD AÑADIDA DE HIDRÓXIDO POTÁSICO EN LA ETAPA DE OXIDACIÓN.	175
5.3. INFLUENCIA DEL PH.	176
5.4. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DEL TAMPÓN FOSFATO.....	179
5.5. INFLUENCIA DEL TAMAÑO DE LA GOTA DE MERCURIO.....	180
5.6. INFLUENCIA DEL TIEMPO DE GOTEÓ.....	180

5.7. INFLUENCIA DE LA AMPLITUD DE PULSO APLICADO.	182
5.8. INFLUENCIA DE LA VELOCIDAD DE BARRIDO.....	184
5.9. INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA.....	185
5.10. ESTUDIO DE LA REVERSIBILIDAD.	186
5.10.1. ESTUDIO DE LA REVERSIBILIDAD DE LOS PROCESOS MEDIANTE TAST.	
.....	186
5.10.2. ESTUDIO DE LA REVERSIBILIDAD DE LOS PROCESOS MEDIANTE PPD.	188
5.10.3. ESTUDIO DE LA REVERSIBILIDAD MEDIANTE VOLTAMPEROMETRÍA	
CÍCLICA.....	194
5.11. DETERMINACIÓN DEL COEFICIENTE DE DIFUSIÓN Y DEL NÚMERO DE	
ELECTRONES.	198
5.12. MECANISMO DE REDUCCIÓN DEL PRODUCTO DE OXIDACIÓN DE LA	
LIDOCAÍNA.	201
5.13. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN.	201
5.14. PROCEDIMIENTO RECOMENDADO PARA LA DETERMINACIÓN DE LIDOCAÍNA.	
.....	203
5.15. REPRODUCIBILIDAD Y SEGURIDAD DEL MÉTODO.	204
5.16. ESTUDIO DE LOS LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN.....	204
5.17. ESTUDIO DE INTERFERENCIAS.....	206
5.18. APLICACIONES.....	207
6. ESTUDIO DE LA ELECTROOXIDACIÓN DE LA PRILOCAÍNA Y LIDOCAÍNA	
EN EL ELECTRODO DE PASTA DE CARBONO. DETERMINACIÓN DE	
PRILOCAÍNA Y LIDOCAÍNA POR VOLTAMPEROMETRÍA CON EPC	
ESTACIONARIO Y ROTATORIO, RESPECTIVAMENTE.	211
6.1. ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO ELECTROQUÍMICO DE LA PRILOCAÍNA CON	
ELECTRODO DE PASTA DE CARBONO.....	214
6.1.1. INFLUENCIA DE LA VELOCIDAD DE ROTACIÓN DEL ELECTRODO DE	
PASTA DE CARBONO.	215
6.1.2. INFLUENCIA DEL pH.	216
6.1.3. INFLUENCIA DE LA AMPLITUD DE PULSO APLICADO.	219
6.1.4. INFLUENCIA DE LA VELOCIDAD DE BARRIDO.....	220
6.1.5. INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA.....	221
6.1.6. ESTUDIO DE LA NATURALEZA DEL PROCESO DE OXIDACIÓN.....	223
6.1.7. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN.	226

6.1.8. PROCEDIMIENTO RECOMENDADO PARA LA DETERMINACIÓN DE PRILOCAÍNA POR VOLTAMPEROMETRÍA DIFERENCIAL DE PULSO CON ELECTRODO DE PASTA DE CARBONO.....	227
6.1.9. REPRODUCIBILIDAD Y SEGURIDAD DEL MÉTODO.	228
6.1.10. ESTUDIO DE LOS LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN.....	228
6.1.11. APLICACIONES.....	229
6.2. ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO ELECTROQUÍMICO DE LA LIDOCAÍNA CON ELECTRODO DE PASTA DE CARBONO.....	230
6.2.1. INFLUENCIA DE LA VELOCIDAD DE ROTACIÓN DEL ELECTRODO DE PASTA DE CARBONO.....	231
6.2.2. INFLUENCIA DEL pH.	233
6.2.3. INFLUENCIA DE LA AMPLITUD DE PULSO APLICADO.	236
6.2.4. INFLUENCIA DE LA VELOCIDAD DE BARRIDO.....	238
6.2.5. INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA.....	239
6.2.6. ESTUDIO DE LA REVERSIBILIDAD.	241
6.2.6.1. REVERSIBILIDAD DE LOS PROCESOS POR VOLTAMPEROMETRÍA DC: Análisis logarítmico de la función intensidad-potencial y determinación del valor $E_{3/4}-E_{1/4}$	241
6.2.6.2. REVERSIBILIDAD MEDIANTE VOLTAMPEROMETRÍA CÍCLICA.....	242
6.2.7. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN.	245
6.2.8. PROCEDIMIENTO RECOMENDADO PARA LA DETERMINACIÓN DE LIDOCAÍNA POR VOLTAMPEROMETRÍA DIFERENCIAL DE PULSO CON ELECTRODO DE PASTA DE CARBONO.....	246
6.2.9 REPRODUCIBILIDAD Y SENSIBILIDAD DEL MÉTODO.	247
6.2.10 ESTUDIO DE LOS LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN.....	247
6.2.11. APLICACIONES.....	248
7. CONCLUSIONES.....	251
7.1. ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO POLAROGRÁFICO Y DETERMINACIÓN DE DIBUCAÍNA POR POLAROGRAFÍA DIFERENCIAL DE PULSO.	253
7.2. ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO POLAROGRÁFICO DE LA NITROSAMINA DE LA PRILOCAÍNA. DETERMINACIÓN DE PRILOCAÍNA POR POLAROGRAFÍA DIFERENCIAL DE PULSO.....	254
7.3. ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO POLAROGRÁFICO DEL PRODUCTO DE OXIDACIÓN DE LA LIDOCAÍNA EN AGUA OXIGENADA. DETERMINACIÓN DE LIDOCAÍNA POR POLAROGRAFÍA DIFERENCIAL DE PULSO.	255

7.4. ESTUDIO DE LA ELECTROXIDACIÓN DE LA PRILOCAÍNA EN EL ELECTRODO DE PASTA DE CARBONO. DETERMINACIÓN DE PRILOCAÍNA POR VOLTAMPEROMETRÍA CON EPC ESTACIONARIO.....	256
7.5. ESTUDIO DE LA ELECTROXIDACIÓN DE LA LIDOCAÍNA EN EL ELECTRODO DE PASTA DE CARBONO. DETERMINACIÓN DE LIDOCAÍNA POR VOLTAMPEROMETRÍA CON EPC ROTATORIO.....	257
8. BIBLIOGRAFÍA	259

OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

El objeto del presente trabajo es el estudio electroquímico de los principios activos dibucaína, prilocaína y lidocaína con propiedades anestésicas locales, de un gran interés farmacológico, con el fin de establecer nuevos procedimientos electroquímicos que permitan la determinación analítica de estos compuestos

Para alcanzar los objetivos marcados se estableció un plan de trabajo, que puede resumirse en los siguientes pasos:

- Recopilación y análisis de los antecedentes bibliográficos sobre los métodos analíticos empleados en la determinación de estos compuestos, propiedades físico-químicas y propiedades generales, que sirvan de base a la planificación de las etapas siguientes.

- Estudio del comportamiento electroquímico de estos compuestos, empleando diferentes técnicas electroquímicas, incidiendo en la influencia en las variables que intervienen y en la naturaleza de los procesos.

- Estudio de las reacciones que permitan obtener derivados electroactivos, si las características electroquímicas del compuesto original no son las adecuadas para fines analíticos y estudio del comportamiento electroquímico de estos derivados.

- Desarrollo de nuevos procesos electroanalíticos, estableciendo las condiciones instrumentales óptimas, los niveles de concentración en que se puede determinar cada analito, las interferencias de los métodos y las posibles aplicaciones.

CAPÍTULO I
INSTRUMENTACIÓN Y REACTIVOS

REACTIVOS

Principios activos: Clorhidratos de dibucaína, lidocaína y prilocaína (Sigma).

Disolventes: metanol (Merck) y agua ultrapura (Millipore).

Reactivos inorgánicos: ácido fosfórico, hidróxido sódico, hidróxido potásico, peróxido de hidrógeno, nitrito sódico (Merck).

Productos para electrodo de pasta de carbono:

Gráfita (Carbone USA CORP 200 mallas).

Parafina líquida Merck.

Todos los reactivos utilizados son de calidad para análisis.

1.1. INSTRUMENTACIÓN.

En este apartado se describen los equipos y electrodos utilizados en el trabajo desarrollado en esta memoria.

EQUIPOS

Polarógrafo Metrohm E-506 equipado con un stand polarográfico 663.

Potenciostato PDC-1212 de Inelecsa equipado con un stand polarográfico Metrohm E-505 y acoplado al ordenador personal IBM compatible.

Potenciostato-galvanostato ECO-Chemie PGSTAT10 equipado con un stand polarográfico Metrohm 663 y acoplado al ordenador personal Hyundai 486/100 provisto de un software GPES 4.2.

pH-metro Crison micro-pH 2002.

Termostato de circulación de agua Tectron 3000543.

Baño de ultrasonidos P-Selecta.

ELECTRODOS Y CÉLULAS DE TRABAJO.

ELECTRODOS:

ELECTRODOS DE TRABAJO:

Electrodo de grafito Metrohm GC-Type 628G 6.1204.000.

Electrodo capilar de mercurio Metrohm 6.1230.010.

Electrodo de gota suspendida Metrohm 6.0335.000.

ELECTRODOS DE REFERENCIA.

Electrodo de calomelanos saturado empleado en el capítulo 3 de este trabajo.

Electrodo de Ag/AgCl/KCl 3 M empleado en los restantes capítulos.

ELECTRODOS AUXILIARES:

Electrodo de barra de platino.

Electrodo de barra de carbono vitrificado.

CÉLULAS

Células electroquímicas Metrohm 6.1415.210 y termoregulables de doble pared Metrohm EA 876-20.

CAPÍTULO II
FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1. ANESTÉSICOS LOCALES

Se denomina anestesia local a la supresión de la sensibilidad, especialmente la dolorosa, en una región del organismo. Esta acción obedece al bloqueo de los impulsos aferentes desde la piel, mucosas y músculos al sistema nervioso central debiendo señalarse que la abolición de la sensibilidad no se refiere sólo a la dolorosa, aunque sí especialmente, sino también a la táctil, térmica y propioceptiva; puede producirse también con dosis elevadas de las drogas correspondientes, bloqueo de los impulsos nerviosas del nervio. Los agentes que ocasionan dichos efectos se denominan anestésicos locales o analgésicos locales.

La supresión de la sensibilidad local o anestesia local puede lograrse no sólo con drogas sino también por procedimientos físicos (frío) o mecánicos (compresión). Así, la anestesia local puede obtenerse: a) por isquemia, ya que la reducción del aporte sanguíneo a un nervio suprime la conducción nerviosa; b) la compresión de un tronco nervioso produce el mismo efecto; c) el frío suprime también la conducción nerviosa.

Pero la supresión de la sensibilidad local se realiza esencialmente con los anestésicos locales, drogas capaces de provocar el bloqueo del impulso en los nervios sensitivos y en sus terminaciones.

Los anestésicos locales pueden definirse como aquellas drogas capaces de bloquear la conducción nerviosa de forma selectiva, reversible y temporal, cuando se aplican a zonas restringidas del organismo, y sin afectar otros tejidos.

Actúan sobre cualquier parte del sistema nervioso y sobre cualquier tipo de fibra nerviosa. Por ejemplo, cuando se aplican a la corteza motora cesa la transmisión de impulsos desde esa área, y cuando se inyectan en la piel impiden la iniciación y transmisión de impulsos sensitivos. Un anestésico local en contacto con un tronco nervioso puede causar parálisis sensitiva y motora en el área inervada. Muchas clases de compuestos interfieren en la conducción, pero a menudo dañan permanentemente a las células nerviosas. La gran ventaja práctica de los anestésicos locales es que su

acción es reversible; su uso va seguido de una recuperación total de la función nerviosa sin pruebas de daños estructurales de las fibras o células nerviosas.

Como los mecanismos iónicos de excitabilidad son semejantes en nervios y músculos, no es sorprendente que estos agentes puedan tener también acciones prominentes sobre todos los tipos de tejido muscular.

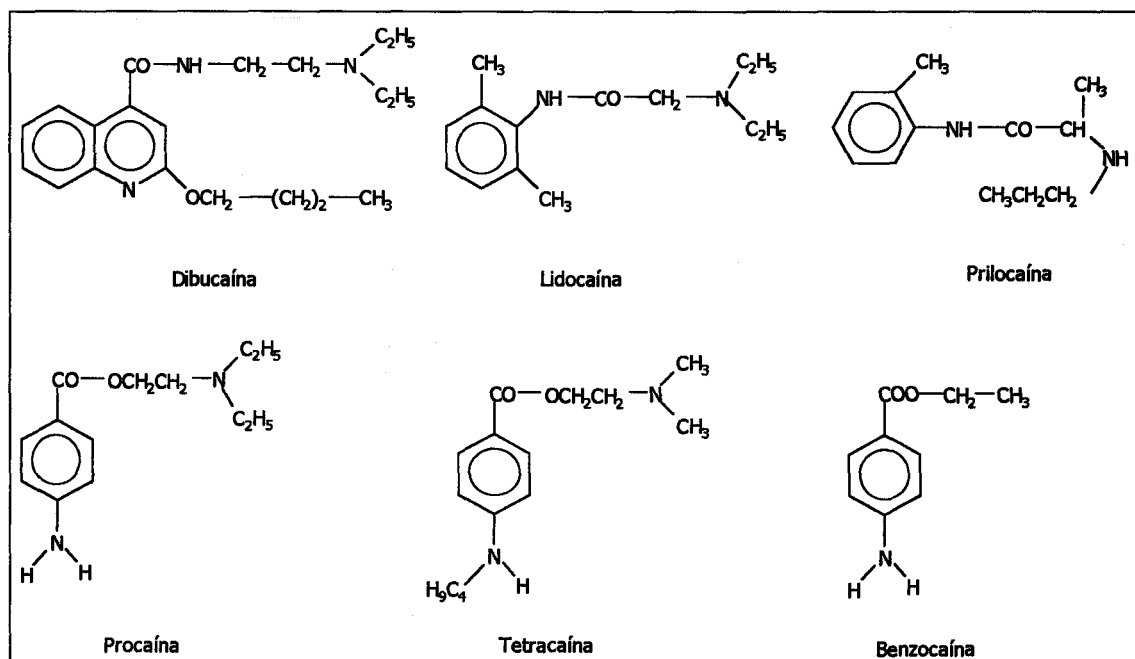
Los anestésicos locales tienen una aplicación muy amplia, sobre todo en cirugía, por lo que la investigación en este terreno es intensiva, con el fin de lograr una droga ideal. En este sentido, las condiciones que debe reunir un anestésico local ideal se dan a continuación:

- 1) La droga debe ejercer acciones selectivas sobre las terminaciones nerviosas y los nervios sensitivos, y debe bloquear la conducción a concentraciones que no lesionen los tejidos adyacentes.
- 2) Dichas estructuras nerviosas deben inhibirse sin excitación previa, es decir, que la droga no ha de ser irritante.
- 3) La anestesia local producida debe de ser de comienzo rápido.
- 4) La anestesia debe ser lo suficientemente duradera como para poder realizar la intervención quirúrgica, pero no debe ser permanente.
- 5) El anestésico local debe ser eficaz por cualquier vía de administración, inyectado o en aplicación local sobre las mucosas.
- 6) La droga debe ser soluble y las soluciones estables, no alterables por el calor para lograr una esterilización conveniente.
- 7) La sustancia debe absorberse poco desde el lugar de la inyección, lo que disminuye su toxicidad y acentúa la acción anestésica local.
- 8) Debe permitir su asociación con la adrenalina, que por vasoconstricción local disminuye la absorción de la droga, con las ventajas antedichas.
- 9) No ha de tener acciones tóxicas sobre el sistema nervioso central ni otros órganos, ni tampoco debe provocar farmacodependencia.
- 10) No debe dar lugar a fenómenos de hipersensibilidad alérgica.

El primer anestésico local descubierto fue la cocaína, alcaloide que se extrae de la coca, arbusto que crece especialmente en Bolivia y Perú. Todos los demás anestésicos se obtienen por síntesis, y se han producido con el fin de hallar sustancias

menos tóxicas que la cocaína y que no provoquen hábito como ella; son los anestésicos locales sintéticos.

El siguiente cuadro, ofrece las fórmulas estructurales de una serie de anestésicos locales seleccionados, entre los que destacamos aquellos que son el objeto de estudio en la presente Memoria: dibucaína, lidocaína y prilocaína.



La mayoría de los anestésicos locales poseen una estructura formada por tres porciones: a) grupo lipofílico, de naturaleza arílico o aromático, que lleva una función éster o una amida (ambas estructuras son isoestéricas); b) al otro extremo, un grupo hidrofílico, la función amina, generalmente terciaria (se combina con agua o ácidos); y c) un puente alifático que une aquellas dos porciones. Desde luego, el éster o amida de la primera porción deriva de un ácido aromático, siendo el más simple el ácido benzoico.

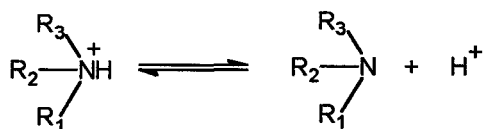
A continuación, se describe las relaciones principales entre la estructura química y la acción farmacológica:

- 1) La unión entre el grupo lipofílico y el grupo hidrofílico es generalmente una función éster, unión entre un ácido y un alcohol, lo que hace a dichas

sustancias susceptibles de hidrólisis in vitro, pero sobre todo en el organismo (inactivación).

- 2) La parte activa de un anestésico local es la base no disociada, que es liberada al pH de los tejidos; ahora bien, cuanto más fuerte sea dicha base, mayor será su disociación y menor su penetrabilidad celular (sólo la parte no disociada puede hacerlo).
- 3) Si existe una cadena alifática unida al nitrógeno amínico del anillo bencénico disminuyen las propiedades básicas del compuesto, con aumento de su potencia anestésica, toxicidad y penetrabilidad, con la consiguiente actividad para la anestesia superficial.
- 4) Si se cambia la función éster por una amida, la droga correspondiente resulta mucho más estable (no es hidrolizada) in vitro y en el organismo; también los compuestos son menos básicos y por lo tanto más potentes y penetrantes en las mucosas que la procaína.
- 5) Originariamente, el ácido aromático que constituye la primera porción de la molécula es un derivado bencénico; si se agrega otro anillo al mismo, la piridina, para dar un núcleo quinolínic se consiguen las modificaciones fisicoquímicas del parrafo anterior, y la droga resultante es muy activa, de gran penetrabilidad y muy tóxica.
- 6) La duplicación de la porción arílica, para dar una doble amida, tiene el mismo efecto, originando anestésicos locales de gran potencia y manifiesta penetrabilidad.
- 7) Los ésteres simples de los ácidos aromáticos son poco potentes pues falta la tercera porción, la amina terciaria, en su molécula; si se aumenta la cadena alquímica del éster se acrecienta algo la potencia anestésica.

Todos los anestésicos locales comúnmente usados contienen un átomo de nitrógeno terciario (o secundario) y por lo tanto pueden existir como amina terciaria (o secundaria) sin carga, o como el catión amonio sustituido cargado positivamente, dependiendo de la constante de disociación (pK_a) del compuesto y el pH de la solución. La ionización de un anestésico local típico puede ilustrarse así:



La anestesia local utilizando drogas puede lograrse por varios procedimientos:

- 1) Anestesia superficial o tópica: Aplicación de la solución anestésica en las mucosas; es fácil de demostrar en los animales y en el hombre actuando sobre la córnea por instilación.
- 2) Anestesia por infiltración: Se inyecta dicha solución debajo de la piel o en la misma, con lo que se anestesian las terminaciones y pequeños nervios; asimismo se comprueba fácilmente en los animales y en el hombre por inyección intradérmica, por ejemplo.
- 3) Anestesia troncular o bloqueo nervioso: Inyección en la vecindad de los troncos nerviosos. Se incluye el bloqueo simpático, donde la solución se inyecta en la vecindad de los nervios y ganglios simpáticos.
- 4) Anestesia epidural o peridural: Es una anestesia troncular en que se bloquean los nervios raquídeos en su salida de la duramadre.
- 5) Anestesia raquídea o espinal: La inyección se efectúa en el espacio subaracnoideo, alrededor de las raíces espinales, lo que constituye una variante de la anestesia troncular.

La intensidad relativa de la acción anestésica de las distintas drogas depende del sitio de aplicación y del método utilizado.

Para que un anestésico local pueda bloquear la conducción de una fibra nerviosa debe penetrar en ella, en la membrana celular; como por lo general la solución anestésica se coloca en la proximidad del nervio, debe ser lo suficientemente hidrosoluble para difundir en el líquido intersticial que lo rodea, o bien liposoluble para penetrar a través de la membrana nerviosa, rica en lípidos. En esta forma, la velocidad de entrada en la fibra depende de la naturaleza química de la droga, de su concentración y del tipo de fibra, existiendo, pues, un período latente desde la aplicación del anestésico hasta el bloqueo nervioso. También debe señalarse que la vaina de mielina, constituye un obstáculo a la penetración de la droga.

Los anestésicos locales son generalmente aplicados en forma de sales, en especial clorhidratos, que por consistir en la unión de un ácido fuerte con una base débil son de reacción ácida, pH 4.0 a 6.0, y muy solubles en agua; se encuentran muy ionizados, por lo que penetran escasamente a través de la membrana de la fibra

nerviosa. En contacto con los tejidos, por su alcalinidad, las bases son liberadas y como se trata de bases débiles se encuentran poco ionizadas; la porción poco ionizada, liposoluble y poco hidrosoluble, es la única que puede atravesar la membrana y así actuar.

La conducción nerviosa exige una activación a lo largo de la fibra, con despolarización de la membrana que origina el potencial en espiga propagado; los estudios efectuados en nervios y fibras nerviosas aisladas han demostrado que los anestésicos locales son capaces de interrumpir la conducción nerviosa, con abolición de dichos potenciales de acción. Se interpreta este efecto como debido a la estabilización de la membrana por la droga, que disminuye la permeabilidad a la entrada del catión sodio en la fibra nerviosa, que normalmente es la causa de la citada despolarización.

Se ha instituido un modelo receptor para dichas drogas a nivel de la membrana celular con las siguientes características: a) tres zonas planas que se unen respectivamente al anillo aromático, al pivote alifático central y los grupos alquílicos de la función amina por enlaces de Van der Waals; b) Una cavidad que contiene una zona aniónica, que se une por un enlace electrovalente con el nitrógeno amínico que se transforma en catión amónico en el interior de la membrana, cuyo pH, más bajo que en su exterior, permite una ionización mayor del anestésico local base; c) una cavidad que contiene dos zonas, una con carga positiva y otra con carga negativa, que se unen respectivamente por enlaces dipolares con el oxígeno del carbonilo con carga fraccionaria negativa y con el carbono del carboxilo con carga fraccionaria positiva. Como puede observarse, la unión de los anestésicos locales con los receptores respectivos se realiza por intermedio de enlaces débiles, lo que explica su reversibilidad y corta duración de acción.

Los anestésicos locales, una vez absorbidos o bien por inyección intravenosa, producen fenómenos referibles a estimulación y depresión del sistema nervioso central. En general, se observan respuestas de estimulación en los animales y en el hombre, en forma de inquietud, temblor y luego convulsiones tónicas y sobre todo clónicas, epileptiformes; estos efectos son proporcionales habitualmente a la potencia anestésica local.

Los fenómenos de estimulación son seguidos de depresión central, en parte por agotamiento de los centros nerviosos y en parte por acción propia de dichas drogas; se produce coma, arreflexia, pudiendo llegarse a la muerte por parálisis del centro respiratorio. En ese caso, los estimulantes respiratorios son ineficaces; la mejor manera de prevenir y tratar la intoxicación por los anestésicos locales es la administración de depresores centrales, siendo los barbitúricos más activos. Así se ha demostrado experimentalmente que estas drogas detienen las convulsiones producidas por dosis tóxicas de los anestésicos locales, y administradas antes de los mismos, las dosis mortales de aquellos aumentan 3 a 4 veces.

Se han elegido para su estudio electroquímico, anestésicos locales de naturaleza amida: dibucaína, lidocaína y prilocaína.

2.1.1. DIBUCAINA

La dibucaína (2-butoxi-N-(2-dietilaminoetil)-cinconinamida) es un derivado de la quinolina que fue preparada por Miescher (1) en un programa dirigido hacia la síntesis de antipiréticos. Se comercializa en forma de clorhidrato (Nupercaína) y es uno de los anestésicos locales de uso común más potente, tóxico y de acción más duradera. Es unas 15 veces más potente y tóxico que la procaína, y su acción anestésica dura más o menos el triple, lo que permite utilizarlo a bajas concentraciones (2).

La disposición del grupo amida presente en la dibucaína puede ser caracterizado como el opuesto al que posee la anilida; ambos tipos de uniones amidas pueden ser útiles en las estructuras de los anestésicos locales. Sin embargo, esta unión en dibucaína así como en lidocaína resulta en compuestos cuyas propiedades farmacológicas son inferiores a la de sus isómeros estructurales.

2.1.2. PRILOCAÍNA

La prilocaína (2-propilamino-2'-propionotoluidida) fue sintetizada por Löfgren y es un anestésico local sintético de tipo amida con un pK_a 7,9.

Sus propiedades farmacológicas se parecen a las de la lidocaína. La iniciación y duración de su acción son más largas que la de esta última. Puede producir somnolencia. Un efecto secundario tóxico exclusivo es la metahemoglobinemia, y su uso está disminuyendo por esta razón. Se ha usado para toda clase de anestesia por infiltración y bloqueo nervioso regional y anestesia espinal.

Existen dos modificaciones de la prilocaína que no producen metahemoglobinemia y son 2-metil-2propilamino-2'-propionotoluidida (quatacaina) y 2-(1-pirrolidino)-2'-propionotoluidida (aptocaína).

2.1.3. LIDOCAÍNA

La lidocaína introducida en 1948 fue sintetizada por Löfgren, y es uno de los anestésicos locales más usados. Tiene un pK_a de 7.8.

Con la síntesis de la lidocaína fueron alcanzados dos objetivos en el camino a obtener el mejor anestésico local. Esta droga es mucho más estable en solución, particular ventaja para la esterilización por calor, y es también más potente y rápida en su actuación.

La estabilidad de la lidocaína a la hidrólisis es alta en comparación con otros de los compuestos tipo éster. Así la lidocaína puede ser calentada con 50 % de ácido sulfúrico o con 20% de hidróxido de potasio etanólico durante 5 horas sin causar más que 3 y 0,5% de descomposición, respectivamente. Esta propiedad se puede explicar por la presencia de dos grupos metilos en posición orto al grupo amida que estabiliza la unión amida, tanto mediante efectos estéricos como electrónicos.

La lidocaína produce una anestesia más rápida, intensa, duradera y amplia que la procaína para una misma concentración y es el agente de elección en aquellos individuos que son sensibles a los anestésicos locales del tipo éster. Además se emplea por vía intravenosa como agente antiarrítmico. La lidocaína es la droga anestésica local más empleada en la actualidad y muy estable con respecto a la procaína, pues esta última es un éster fácilmente hidrolizable, lo que no sucede con la primera.

La lidocaína es capaz de interrumpir la conducción nerviosa debido a la estabilización de la membrana del nervio por la droga, que disminuye la permeabilidad a la entrada del catión sodio en la fibra nerviosa.

Los efectos que produce la lidocaína son: analgesia central, acción convulsionante y la anestésica general en los animales y en el hombre, siendo frecuente una acción sedante, con dosis no muy elevadas. Pero además dicha droga posee, a pequeñas dosis, una acción anticonvulsionante, demostrada en el gato y también en el hombre, pero este tratamiento no ha entrado extensamente en la práctica.

La lidocaína se absorbe con relativa rapidez después de su administración parenteral y desde el tracto gastrointestinal (3)(4)(5). Aunque es efectiva cuando se usa sin ningún vaso constrictor, en presencia de adrenalina la velocidad de absorción y la toxicidad disminuyen y la acción se prolonga.

En los animales de experimentación la sobredosis de lidocaína produce la muerte por fibrilación ventricular o paro cardiaco. Un notable efecto secundario de la lidocaína es la somnolencia. También hay gran incidencia de mareos, que puede deberse a un metabolito y no a la misma lidocaína (3).

La lidocaína posee cierta acción bacteriostática y aún bactericida frente a gérmenes banales como el estafilococo, el estreptococo y el colibacilo.

La biotransformación de la lidocaína se produce en el hígado. Las transformaciones son complejas e incluyen procesos de oxidación, hidrólisis y sulfoconjugación de los metabolitos; estos metabolitos se excretan en la orina.

El clorhidrato de lidocaína, U.S.P. (lignocaína; XYLOCAÍNA, otros) es muy soluble en agua y alcohol. Las preparaciones oficiales incluyen inyecciones, cremas, ungüento, jalea, solución tópica y aerosol tópico.

2.2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS SOBRE LOS MÉTODOS DE ANÁLISIS DE LOS ANESTÉSICOS LOCALES OBJETO DE ESTUDIO

2.2.1. DIBUCAÍNA

Las técnicas utilizadas en la determinación de dibucaína o clorhidrato de dibucaína en preparaciones farmacéuticas o en muestras reales han sido la volumetría, cromatografía, isotacoforesis capilar, espectrofotometría, fluorimetría y polarografía.

VOLUMETRÍA

L.G. Chatten y col. en 1959 identifican y determinan dibucaína por primera vez en forma de derivado de tetrafenilboro por valoración en acetona con HClO_4 en ácido acético glacial y utilizando cristal violeta como indicador (6).

La valoración conductimétrica de la dibucaína es llevada a cabo por H. Ellert y col. en 1967 empleando HClO_4 en ácido acético y electrodos de platino, detectando el punto final gráficamente (7). La misma técnica es aplicada por Z. Blagojevic y col. ese mismo año utilizando ácido wolframiosilícico (8).

Posteriormente, Olech en 1971, describe otro método para llevar a cabo la valoración de la dibucaína mediante KBrO_3 , previa etapa de extracción (9).

Koval'chuk y col. en 1984 realizan la valoración potenciométrica en medio etanol- CHCl_3 utilizando como indicador fenolftaleína (10).

La valoración potenciométrica de la dibucaína en colirios de ojos es realizada por S. Matejek y col. en 1987 con tetrafenilborato de sodio empleando electrodos de hilo de aluminio recubierto con membrana de PVC reblandecida con 2,4-dinitrofeniloctiléter y SCE con puente salino de NaCl (11).

I.P. Netesina y col. en 1992 utilizan esta técnica mediante ácido molibdofosfórico y un electrodo de ion selectivo (12).

CROMATOGRAFÍA

CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA

J.A. Fresen en 1967 determina compuestos homólogos y análogos a la dibucaína utilizando placas de celulosa 300 MN, impregnadas con alcohol oleico y utilizando como eluyentes solución reguladora NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 (pH 0,4 a 11) (13).

E. Roeder y col. en 1969 llevan a cabo la separación de la dibucaína de otros anestésicos locales utilizando mezcla azeotrópicas de acetona-ciclohexano, alcohol isopropílico-isopropiléter, metanol-acetona-ciclohexano, etanol-benceno-ciclohexano y etilmetilcetona-heptano, y mediante placas recubiertas con Kieselgel GF₂₅₄, mezcladas con Na_2CO_3 y activadas a 105°C durante 30 minutos (14).

Con esta técnica, M. Amin y col. en 1977, y utilizando placas de gel de sílice 60F₂₅₄, separan dibucaína de otros principios activos existentes en pomadas y supositorios como hidrocortisona, o sus acetatos o hexanoatos, hexaclorofano, undecanoato de clemizole y hexaclorofanoato de clemizole (15).

J. Turan y col. en 1989 determinan dibucaína en preparaciones farmacéuticas utilizando placas de Silufol con cinco fases móviles diferentes para cromatografía de capa fina bidimensional (16).

CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA

K. Igarashi en 1987, determinan dibucaína y sus metabolitos utilizando una columna de Cosmosil 5 C18 y detección por fluorescencia (excitación a 330 nm, detección a 440 nm) (17).

CROMATOGRAFÍA DE GASES

J. Buechi y col. en 1972 utilizan un sistema con dos columnas de vidrio (Anakrom ABS, Gas-Chrom Q), con un detector de ionización de llama y nitrógeno como gas portador (18).

M. Kageura y col. en 1978, emplean una columna empaquetada con Poly-I-110 sobre Gas-Chrom Q y detección por espectrometría de masas, utilizando He como gas portador (19).

David Alkalay y col. en 1981, utilizan una columna de vidrio silanizado y OV-1 sobre Chromosorb W-HP a 215°C, detección de espectrometría de masas de cuadrupolo y CH₄ como gas portador (20).

K. Igarashi y col. en 1987 llevan a cabo la determinación de dibucaína en muestras biológicas en una columna de vidrio empaquetada con OV-101 sobre Chromosorb W-HP a 240° C, con detección de N-P y He como gas portador (21).

ELECTROFORESIS CAPILAR

J. Kostelecka y col en 1987, emplean esta técnica en la determinación de dibucaína en preparaciones farmacéuticas mediante el uso de sistema acetato-acético y ácido fórmico como electrolitos inicial y final, y detector de conductividad (22).

ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN MOLECULAR

J. Büchi y col. en 1960 registran los espectros de absorción de la dibucaína y de sus productos de degradación, así como, los del 2-alcoxi- derivado de la dibucaína (23).

Noriko Ohno y T. Sakai en los primeros años de la década de los 80 emplean la formación de pares iónicos en la determinación espectrofotométrica de dibucaína y difenidramina, previo paso de extracción, con medida de la absorbancia a 555 y 573 nm, y de dibucaína y maleato de clorferinamina mediante medida de la absorbancia a 555 y 575 nm (24)(25).

M.A. Korany y col. en 1984 emplean la espectrofotometría de primera derivada para la determinación de clorhidrato de dibucaína en diferentes preparaciones farmacéuticas, previa extracción con NaOH (26).

G. Saleh en 1995 determina dibucaína por medida a 555 nm, previa etapa de extracción (27).

FLUORIMETRÍA

Joel D. Martucci en 1975, determina dibucaína fluorimétricamente estudiando la fluorescencia de dibucaína en soluciones acuosas y otros disolventes a diferentes valores de pH (28).

TÉCNICAS ELECTROQUÍMICAS

POLAROGRAFÍA

H. Burghardt en 1968 realiza la determinación del derivado nitroso de la dibucaína, entre otros compuestos, mediante polarografía (29).

ELECTRODOS DE IÓN SELECTIVO

K. Shirahama y col. en 1983 prueban la selectividad iónica a las formas catiónicas de aminas aromáticas de algunos anestésicos locales como dibucaína, de una membrana de gel de PVC, que contenía dibenzo-24-corona-8 o dibenzo-18-corona-6 (30).

2.2.2. PRILOCAÍNA

La bibliografía encontrada para la prilocaína ha sido sin duda más escasa que para los otros anestésicos locales estudiados.

VOLUMETRÍA

E.F. Salim y col. en 1967, identifican clorhidrato de prilocaína mediante los espectros de IR obtenidos mediante técnica de disco de KBr o por sus reacciones colorimétricas con $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ en caliente y con CoCl_2 . Los ensayos son realizados mediante valoración con AgNO_3 (con K_2CrO_4) como indicador o con HClO_4 en ácido acético anhidro y en presencia de acetato de mercurio (II) (cristal violeta como indicador) (31).

CROMATOGRAFÍA

De las técnicas utilizadas en la determinación de la prilocaína la más empleada es la cromatografía.

CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA

J. Hermansson en 1983, resuelve mezclas de drogas, entre las que se encuentra la prilocaína, racémicas mediante cromatografía líquida utilizando α_1 -ácido glicoproteínico inmovilizado con micropartículas de sílice como fase estacionaria quiral (32).

R. Whelpton y col. en 1990, realizan la resolución directa de drogas racémicas como prilocaína utilizando una fase estacionaria quiral formada por adición de sílice aldehído y detección a 254 nm (33). P. Erlandsson y col. en 1990 determinan prilocaína en plasma humano en una columna de Spherisorb 5 CN con una precolumna de Co:Pell ODS, con fase móvil de ácido fosfórico en acetonitrilo/agua y detección electroquímica a 0.7 y 0.9 V frente a un electrodo de referencia de Pd (34).

M. Siluveru y col. en 1996, determinan R(-) y S(+)-prilocaína en suero humano utilizando una columna de naftiletilamina, con hexano/1,2-dicloroetano/metanol/TFA como fase móvil y detección a 220 nm (35).

CROMATOGRAFÍA DE GASES

C. Koeppel y col. en 1991, determinan prilocaína entre otras drogas en orina y plasma mediante cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas con la formación de fragmentos con ion molecular de $[M+12]^+$ debido a la adición de metanol a las muestras (36).

ELECTROFORESIS CAPILAR

M. Siluveru y col. en 1997, determinan R(-) y S(+) prilocaína en suero humano mediante electroforesis capilar utilizando ciclodextrina derivatizada y detección a 215 nm (37).

2.2.3. LIDOCAÍNA

La lidocaína es el anestésico más estudiado de todos los que se ocupa esta Memoria. Las técnicas empleadas son muy diversas y entre todas ellas destacan la volumetría y la cromatografía.

VOLUMETRÍA

K. Bullock y col. en 1955 preparan y purifican muestras de lidocaína, y determinan la propia lidocaína, así como sus clorhidratos anhidros y monohidratados mediante valoración ácida por retroceso con verde de bromocresol como indicador (38).

Sakurai Hiroshi y col. en 1956, determinan clorhidrato de lidocaína en inyecciones mediante valoración en medio no acuoso con ácido p-toluensulfónico y HClO_4 , utilizando como indicador naranja de metilo (39).

H.M. Koehler y col. en 1964 determinan sales de lidocaína mediante valoración con HClO_4 en ácido acético anhidro (40).

R. Vasiliev y col. en 1965, determinan lidocaína en medio no acuoso en presencia de amarillo de metanilo, utilizando HClO_4 en dioxano y detección potenciométrica (41).

Claudine Lemahieu-Hode y col. en 1972, emplean la valoración conductimétrica para la determinación de clorhidrato de lidocaína, utilizando hidróxido de tetrabutilamonio en metanol/alcohol isopropílico (42).

Istvan Simonyi y col. en 1973 determinan lidocaína en inyecciones basándose en la reacción de las bases orgánicas con sulfato de dodecilsodio, que originan sales insolubles en agua, y utilizando amarillo de dimetilo y azul de metileno como indicadores (43).

La valoración potenciométrica la emplea G. Tortolani en 1974 para la determinación de muestras que contenían amidopirina, el nicotinato del salicilato de guaiacilo y clorhidrato de lidocaína, utilizando HClO_4 en medio acético anhidro (44).

Leif Andersson y col. en 1978, describen la valoración de la lidocaína utilizando HClO_4 , verde de malaquita como indicador y detección fotométrica, controlada por microordenador (45).

Claudine Lemahieu y col. en 1980, valoran clorhidratos de amilocaína, etilmorfina, cisteína, efedrina, lidocaína, papaverina, procaína y quinina, y los bromohidratos de homatropina y hioscina en dimetil sulfóxido con AgNO_3 y detección del punto final por conductimetría, potenciometría y polarimetría (46).

Dieter Volkmann en 1982 determina lidocaína, entre otros compuestos, utilizando un fototitulado Mettler DK_{18} , a 570 nm y amarillo de dimetilo o NN-dimetil-4-(m-tolilazo)anilina como indicador, o bien a 540 nm, cuando se utiliza como indicador una mezcla de azul Oracet B y los indicadores anteriormente mencionados (47).

La valoración potenciométrica automática la aplican P.A. Johansson y col. en 1987 para la determinación de lidocaína en preparaciones farmacéuticas utilizando exceso de HCl y valorando con NaOH (48).

G.X. Li y col en 1994 determinan clorhidrato de lidocaína en inyecciones mediante volumetría directa ácido-base utilizando C. I. Basic Blue 9 y azul de bromotimol como indicadores, previa extracción (49).

K. Nikoloc y col. en 1987 determinan el yoduro de amonio cuaternario de lidocaína mediante el uso de un valorador automático con cátodo y anodo de plata y un electrodo de Hg_2SO_4 como referencia (50).

CROMATOGRAFÍA

CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA

Krystyna Lenartowicz en 1971, separa lidocaína y sus productos de descomposición en placas de Silica Gel G impregnadas con NaOH, utilizando como fase móvil CHCl_3 -benceno, secando la placa a 20 °C y revelando las placas con solución de iodo en KI, para identificar la lidocaína, y con NaNO_2 y 2-naftol alcalino para la localización de los productos de descomposición (51).

C. Moffat en 1975, realiza la estandarización del sistema de cromatografía de capa fina para la identificación de drogas básicas, entre las que se encuentra la lidocaína, mediante placas de Silica Gel reveladas con NaOH y elución con alguno de los disolventes siguientes: ciclohexano-tolueno-dietilamina, CHCl_3 -metanol o acetona (52).

Kwan Young Lee y col. en 1978 determinan simultáneamente lidocaína y otras drogas antiarrítmicas mediante cromatografía de capa fina de alta resolución, utilizando placas de Silica Gel 60 F_{254} , eluyendo con una mezcla de benceno-acetato de etilo-metanol y detección a 220 nm, identificando lidocaína y fenitoin (53).

Aly M. Taha y col. en 1979, detectan selectivamente lidocaína entre otras drogas utilizando placas de Silica Gel G, con metanol- NH_3 como eluyente, y revelando las placas con solución de cloranil en acetonitrilo y calentando de 105 °C a 110°C (54). Jerzy Jarzebinski y col. utilizan cromatografía de capa fina para la separación de lidocaína y otros compuestos en preparaciones farmacéuticas y posterior detección densitométrica (55).

Dennis Jukofsky y col. en 1980, realizan una diferenciación cualitativa entre cocaína, lidocaína y mezclas de cocaína y lidocaína utilizando placas de Silica Gel 60 F₂₅₄, con CHCl₃-metanol-NH₃ o acetato de etilo-metanol-NH₃ como eluyentes y revelando el cromatograma con H₂SO₄ y yodo-platino (56).

Lorenzo Galante y col. en 1982, detectan e identifican lidocaína en tejidos en placas de Silica Gel, con CH₂Cl₂-etil metil cetona-NH₃ como eluyentes y revelando de forma secuencial con ninhidrina, H₂SO₄, yodo-platino y reactivo de Marquis (57).

J. Jarzebinski y col. en 1986, identifican clorhidrato de lidocaína en preparaciones farmacéuticas mediante placas de Silica-Folien F_{254/366}, con 1,4-dioxan/xileno/tolueno/2-propanol como fase móvil, realizando el revelado con reactivo Dragendorff y posterior determinación densitométrica (58).

M.S. Ionescu y col. en 1987, separan lidocaína en preparaciones farmacéuticas utilizando placas de Silica Gel GF₂₅₄, con benceno/metano/ácido acético anhídrido como fase móvil y posterior determinación densitométrica midiendo a 230 nm (59).

L. Zivanovic y col. en 1988, separan lidocaína en preparaciones farmacéuticas mediante placas de Silica Gel GF₂₅₄, con éter isopropílico/acetona/dietilamina como fase móvil, con detección a 254 nm y determinación densitométrica (60).

P. Xu y col. en 1991, determinan cuantitativamente lidocaína en una mezcla de otros anestésicos mediante TLC revelada a 223 nm con ciclohexano/benceno/etilendiamina (61).

CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA

Esta técnica ha sido la más empleada para la determinación de lidocaína, y sus metabolitos.

M. Caude y col. en 1976, determinan varias drogas contenidas en diferentes preparados farmacéuticos, entre las que se encuentra la lidocaína, en una columna de Spherosil, en modo isocrático y presión inferior a 5000 kPa (62). Reginald F. Adams y col. determinan lidocaína y procainamida en suero utilizando una columna en fase

reversa de ODS-Sil-X-I a 40 °C y 800 psi, con fase móvil de acetonitrilo/tampón fosfato y detección a 205 nm (63).

N. Masoud y col. en 1978, determinan simultáneamente lidocaína y tiopentona en plasma utilizando una columna de acero inoxidable empaquetado con SIL-X-1 ODS, con fase móvil de acetonitrilo/tampón fosfato y detección a 205 nm (64). Prem K. Narang y col. determinan lidocaína y sus metabolitos en suero utilizando una columna de μ Bondapak C₁₈, con fase móvil de acetonitrilo/tampón fosfato y detección a 210 nm (65). Per-Olof Lagerstrom y col. determinan lidocaína, junto a otras drogas, utilizando una columna de acero inoxidable conteniendo micropartículas de sílice y detección UV (66).

Per Helboe y col. en 1979, determinan lidocaína, fenilefrina y valerato de betametasona en supositorios mediante cromatografía líquida de par iónico en fase reversa, utilizando una columna de Nuleosil 5 C8, con metanol/tampón fosfato como fase móvil, sulfato de dodecil sodio como fuente de contraiones, y detección fotométrica a 260 nm (67). Roger L. Natio y col. determinan simultáneamente lidocaína y sus metabolitos N-dialquilados utilizando una columna de alquilfenil μ Bondapak, con fase móvil de acetonitrilo/tampón fosfato y detección a 200 nm (68). J.L. Wisnicki y col. analizan lidocaína y sus metabolitos dialquilados utilizando una precolumna Co:Pell ODS, una columna de μ Bondapak C₁₈, fase móvil de acetonitrilo/tampón fosfato y detección a 205 nm (69). C.P. Leung analiza clorhidrato de lidocaína presente en preparados farmacéuticos mediante una columna empaquetada con LiChrosorb C₂, con fase móvil de metanol/tampón fosfato y detección a 263 nm (70).

Jeremy Hill y col. en 1980, determinan lidocaína y sus dietilados metabolitos en plasma utilizando una columna de RP-8, con fase móvil de acetonitrilo/tampón fosfato y detección a 195 nm (71). James G. Flood y col. determinan simultáneamente lidocaína, disopiramida y quinidina mediante una columna de μ Bondapak C₁₈, con fase móvil de tampón fosfato/acetonitrilo y detección a 205 nm (72).

F. Smith y col. en 1981, determinan lidocaína y sus productos de degradación en una solución de dextrosa utilizando una columna de Spherisorb ODS, con acetonitrilo/tampón fosfato como fase móvil y detección a 254 nm (73). Pokar M.

Kabra y col. determinan lidocaína entre otras drogas antiarrítmicas utilizando una columna de Ultrasphere octyl a 40 °C, con acetonitrilo/tampón fosfato como fase móvil y detección mediante espectrofotometría y fluorimetría (74). Sigmund M. Waraszkiwicz y col. analizan clorhidrato de lidocaína con epinefrina en soluciones inyectables utilizando una columna de μ Bondapak C₁₈, con octano-1-sulfonato de sodio/EDTA/ácido acético/acetonitrilo/metanol como fase móvil y detección a 254 nm para metilhidroxibenzoato y clorhidrato de lidocaína (75).

C. A. Neff-Davis y col. en 1982, determinan lidocaína y sus dos metabolitos activos en suero canino utilizando una columna de Partisil ODS-3 equipada con una precolumna de Co.Pell C₁₈, con fase móvil de acetonitrilo/tampón fosfato y detección a 210 nm (76).

R. Lindberg y col. en 1983, determinan lidocaína y sus metabolitos dietilados mediante una columna de Nucleosil C₈, con tetrahidrofurano/tampón fosfato como fase móvil y detección a 216 nm (77). F.T. Noggle y col. utilizaron para la determinación de lidocaína y otras drogas (78), un método descrito en 1982 para la determinación de cocaína y de sus compuestos análogos, utilizando esta técnica después de realizar la derivatización con isotiocianato de benceno.

M.K. Halbert y col. en 1984, determinan lidocaína y sus metabolitos en suero de sangre utilizando una columna de sílica, con fase móvil de acetonitrilo/fosfato amónico y detección electroquímica, utilizando electrodo de carbono vitrificado, a 1.2 V (79). K. Kushida y col. determinan simultáneamente lidocaína y sus metabolitos utilizando una columna empaquetada con LiChrosorb Si-60, con fase móvil de ácido clorhídrico/tetrahidrofurano y detección a 225 nm (80). C.B. Swezey y col. determinan lidocaína en suero utilizando una columna de ODS-3 equipada con una precolumna de material ODS y que opera a 60 °C, fase móvil de acetonitrilo/tampón fosfato y detección a 210 nm (81). F.A. Luzzi y col. determinan lidocaína y sus metabolitos utilizando una columna de Zorbax ODS, con fase móvil tampón fosfato/acetonitrilo/trietilamina y detección a 200 nm (82).

L.J. Duse y col. en 1985, determinan lidocaína y otros compuestos en plasma utilizando una columna de μ Bondapak C₁₈, con fase móvil de acetonitrilo/tampón fosfato y detección a 214 nm (83). R. Kawai y col. cuantifican simultáneamente

lidocaína y sus metabolitos en una columna empaquetada con μ Bondapak C₁₈, con fase móvil de acetonitrilo/tampón fosfato y detección a 210 nm (84).

T.G. Hurdley y col. en 1986, separan lidocaína de otros anestésicos locales utilizando una columna de ODS-Hypersil, con fase móvil metano/H₂O/H₃PO₄/hexilamina y detección a 254 nm (85). R.M. Smith y col. separan lidocaína, cocaína, amilocaína y benzocaína utilizando una columna empaquetada con Hypersil ODS y que opera a 30 °C, con fase móvil de metanol/ácido fosfórico/hexilamina, estudiándose los efectos de pequeños cambios en la composición de la fase móvil, pH, la temperatura de la columna y el uso de Partisil ODS y Zorbax ODS en la retención de los analitos (86). H.R. Angelo y col. determinan simultáneamente disopiramida, lidocaína y sus metabolitos monodialquilados en suero utilizando una columna de Supelcosil CN, con fase móvil de acetonitrilo/tampón fosfato y detección a 215 nm (87). T. Annesley y col. determinan lidocaína, procainamida y N-acetilprocainamida utilizando una columna de μ Bondapak ODS, con fase móvil de metanol/tampón acetato y detección a 220 nm (88). H. Murakita y col. determinan por medio de un sistema automatizado lidocaína y otros compuestos en suero utilizando una precolumna de Shim-pack SPC-RP 1, una columna de Shim-pack CLC-ODS y fase móvil de trietilamina/acetonitrilo (89). H. F. Proelss y col. determinan lidocaína, junto a otras drogas antiarrítmicas y sus principales metabolitos en suero, utilizando una columna de CN, con fase móvil de acetonitrilo/metanol/tampón fosfato y detección a 205 nm (90).

N. Daoud y col. en 1987, determinan lidocaína y sus metabolitos en plasma de sangre utilizando una columna de Lichrocart HPLC empaquetada con LiChrosorb RP-Slect B, precolumna empaquetada con LiChrosorb RP-Slect B, con fase móvil de 1-propanol/tampón fosfato/decanosulfonato y detección a 210 nm (91). Y. K. Tam y col. determinan lidocaína y sus metabolitos en plasma y orina humana utilizando una columna de Novapak C₁₈, fase móvil de acetonitrilo/tampón fosfato/trietilamina y detección a 200 nm (92).

S.C. Monkman y col. en 1988, determinan lidocaína en tejidos fetales utilizando una columna de S5SCX, con fase móvil acetonitrilo/metanol/NH₄ClO₄ y detección electroquímica utilizando electrodo de carbono vitrificado a 1.0V frente a Ag-AgCl (93).

S.C. Monkman y col. en 1989, determinan lidocaína en muestras de tejidos contiguos a la placenta transabdominal utilizando una columna de intercambio catiónico de Spherisorb S5, con fase móvil de acetonitrilo/ NH_4ClO_4 /metanol y detección electroquímica a 1.0 V utilizando electrodo de carbono vitrificado frente a Ag-AgCl (94). K. Fukushima y col. determinan lidocaína y sus metabolitos en sangre empleando distintas técnicas como inmunuensayo enzimático, polarización de fluorescencia, cromatografía de gases y HPLC (95). L. Wu y col. determinan simultáneamente lidocaína, sus metabolitos y otras drogas utilizando una columna de MicroPak MCH-5 ODS, con fase móvil acetonitrilo/N-butilamina/ácido-acético y detección a 220 nm (96).

Sintov y col. en 1989 determinan lidocaína en plasma en una columna de μ Bondapak C_{18} a 30 °C previa derivatización con 9-fluorenilmetilcloroformato, con fase móvil ácido acético/trietilamina/acetonitrilo y detección fluorescente a 313 nm o detección por espectrometría de masas (97).

P.J. Howard y col. en 1990, estiman concentraciones de lidocaína en sangre utilizando una columna de Hyrpasil 10 ODS, con fase móvil de H_2O /metanol/propan-2-ol/acetato de sodio y detección a 220 nm (98). Y.K. Tam y col. realizan la cuantificación de tres metabolitos de lidocaína y sus conjugados en orina (99) tal y como está descrito en la referencia 101.

A. Benko y col. en 1991, realizan un análisis toxicológico de lidocaína en materiales biológicos utilizando una columna de BST, fase móvil de acetonitrilo/ H_2O /THF/ácido fosfórico concentrado y detección a 230 nm (100).

Y. Che y col. en 1992, determinan simultáneamente lidocaína y monoetilglicinaxilidida en una columna de μ Bondapak C_{18} , con acetonitrilo/tampón fosfato como fase móvil y detección a 205 nm (101). K.Q. Ren y col. determinan simultáneamente lidocaína y mexiletina en plasma utilizando una fase móvil de metanol/butilamina/ácido acético anhídrido y detección a 220 nm (102). I.R. Tebbett y col. determinan lidocaína y sus metabolitos en orina de caballo utilizando una columna de Zorbax C_8 , una precolumna de Guard-PaK CN, fase móvil de acetonitrilo/NN-dimetiloctilamina/tampón fosfato y detección a 230 nm (103). Y. Che y col. determinan lidocaína y monoetilglicinaxilidida previa extracción en fase sólido

utilizando una columna de μ Bondapak C₁₈, con fase móvil de acetonitrilo/tampón fosfato y detección a 210 nm (104). L. Ye y col. determinan lidocaína en fluidos humanos y tejidos grasos mediante HPLC en fase reversa utilizando una columna de Shim-pack CLC-C₈, con fase móvil de metanol/n-butilamina/ácido acético anhidro y detección a 214 nm (105). S. Sarre y col. utilizan microdiálisis en la determinación de drogas como lidocaína y posterior análisis por HPLC en una columna de Ultrasphere ODS con precolumna μ Bondapak C₁₈-Corasil, fase móvil de tampón fosfato-acetonitrilo y detección desde 220 a 270 nm (106).

X.Q. Chen y col. en 1993, determinan lidocaína y bupivacaína en plasma humano utilizando una columna de Beckman ODS, con fase móvil metanol/tampón fosfato y detección a 218 nm (107). J.X. Zhou y col. separan procaína, lidocaína y ametocaína mediante cromatografía líquida utilizando una columna de Nucleosil C₁₈, con fase móvil de metanol/tampón fosfato que contiene trietilamina, y detección amperométrica utilizando electrodos modificados de α -alúmina, operando a 1.2 V frente a SCE (108). J.X. Zhou y col. comparan los resultados obtenidos para lidocaína, ametocaína y procaína con columna de Nuceosil C₁₈, fase móvil de metanol/tampón fosfato conteniendo trietielamina y detección amperométrica a 1.2 V, con los obtenidos mediante cromatografía líquida con detección UV (109).

X.Y. Wang y col. en 1994, determinan simultáneamente lidocaína y bupivacaína en suero humano mediante HPLC en fase reversa utilizando una columna de μ Bondapak C₁₈ con precolumna Guard-Pak, fase móvil metanol/n-butilamina/ácido acético y detección a 254 nm (110). Y. Chen y col. estudian lidocaína y su metabolismo utilizando HPLC, GC y FPIA (inmunoensayo de polarización fluorescente) (111). H. Satake y col. determinan lidocaína en sangre humana utilizando una columna de TSKgel ODS-120^a que opera a 60 °C, con fase móvil de tampón fosfato/acetonitrilo y detección a 220 nm (112).

H. Lotfi y col. en 1997 determinan simultáneamente lidocaína y bupivacaína en plasma humano utilizando una columna de Nucleosil C₁₈, con fase móvil de acetonitrilo/tampón fosfato y detección a 210 nm (113). O. Atay y col. determinan clorhidrato de cocaína en mezclas de clorhidrato de procaína, clorhidrato de lidocaína y cafeína mediante HPLC utilizando una columna de μ Bondapak C₁₈, con fase móvil de metanol/H₂O/H₃PO₄/hexilamina y detección por diodo array (114).

CROMATOGRAFÍA DE GASES

J. Vessman y col. en 1962, estudian el comportamiento cromatográfico de la lidocaína y otros compuestos bajo diversas condiciones (115).

J. Vessman en 1964, determinan, mediante cromatografía gaseosa, aminas de altos puntos de ebullición, entre las que se encuentra la lidocaína, utilizando una columna con SE-30 sobre Chromosorb W silanizado y detector de ionización de llama (116).

F. Reynolds y col. en 1968, determinan bupivacaína, lidocaína y mepivacaína en sangre humana mediante cromatografía gas-líquido en una columna de SE 30 o E 301 sobre Chromosorb G silanizada *in situ* que operaba a 210 °C, N₂ como gas portador y detector de ionización de llama (117).

A. Cometti y col. en 1971 determinan lidocaína y otros compuestos presentes en supositorios utilizando una columna de vidrio que contenía polioxietilenglicol y SE-30 en Gas-Chrom P, impregnada con KOH y que operaba a 195 °C, con N₂ como gas portador y detector de ionización de llama (118). John M. Strong y col. determinan simultáneamente lidocaína y sus metabolitos dietilados utilizando una columna de vidrio empaquetada con SE-30-OV-17 en Chromosorb que operaba a 210°C, con He como gas portador y detección por espectrometría de masas de cuadrupolo (119).

V. Tomaskova en 1972, identifican lidocaína y otros anestésicos locales mediante cromatografía gas-líquido, y se calculan los índices de Kovats a partir de los valores de retención obtenidos, mediante el uso de fases estacionarias de diferente polaridad (120).

J.G. Kelly y col. en 1974, comprueban que puede determinarse mexiletina en presencia de lidocaína sin que ésta última interfiera, utilizando una columna de vidrio que contiene HI-EFF 8BP en Gas-Chrom Q y que operaba a 220 °C, con He como gas portador y detector de ionización de llama de RbBr (121). L.E. Mather y col. determinan lidocaína, entre otras drogas básicas, en una columna de vidrio con OV-17 sobre Gas-Chrom Q, a 180°C, con He como gas portador y detector de ionización de llama (122). M. Spencer y col. resuelven la determinación de lidocaína

en presencia de glucosa, manteniendo la temperatura de la columna a 175 °C y no a 205 °C (123).

R.L. Nation y col. en 1976, determinan lidocaína y sus metabolitos en plasma, en una columna de vidrio empaquetada con Ucon 75-H-90,000 y KOH sobre Gas-Chrom Q, a 175 °C, con N₂ como gas portador y detector de ionización de llama (124). T.R. Irgens y col. determinan lidocaína en sangre en una columna de vidrio que contiene KOH y Carbowax en Chromosorb W AW-DMCS y que opera a 210 °C, N₂ como gas portador y detector de ionización de llama (125). H.B. Hucker y col. determinan lidocaína en plasma en una columna de vidrio que contiene OV-17 sobre Gas-Chrom Q y que opera a 200 °C, He como gas portador y detector de N-P (126).

Emiko Natio y col. en 1977, determinan lidocaína en tejidos utilizando una columna empaquetada con OV-17 sobre diatomeas, con N₂ como gas portador y detector de ionización de llama (127). G. Caille y col. determinan lidocaína en plasma humano en una columna de OV-17 sobre Gas-Chrom Q, a 210 °C, N₂ como gas portador y detector de ionización de llama (128).

M. Vigouroux y col. en 1978, determinan lidocaína y etidocaína, previa extracción, en una columna empaquetada con OV-17 sobre Chromosorb W DMCS y N₂ como gas portador (129). Clifford B. Walberg compara los resultados obtenidos mediante inmunoensayo enzimático (130) con los obtenidos por cromatografía gas-líquido, utilizando una columna convencional de SE-30 sobre Gas-Chrom Q, a 200°C, He como gas portador y detector de ionización de llama. M.T. Rosseel y col. determinan lidocaína y sus metabolitos dietilados utilizando una columna capilar de vidrio revestida con OV-17, que opera a 190 °C, con H₂ como gas portador y detector de ionización de llama de N-P (131). B.J. Kline y col. determinan lidocaína en plasma en una columna de vidrio que contiene OV-17 sobre Gas-Chrom Q, a 210 °C, N₂ como gas portador y detector de ionización de llama (132). Charles E. Hignite y col. determinan lidocaína y sus metabolitos dietilados en plasma y orina utilizando una columna de vidrio empaquetada con OV-1 sobre Gas-Chrom Q y detección de espectrometría de masas (133). Philip J. Palermo y col. determinan simultáneamente fenol, cloroxilenol y clorhidrato de lidocaína en cremas antisépticas de uso tópico utilizando una columna de acero inoxidable silanizado empaquetada con OV-225 sobre Supelcoport operando a temperatura programada, He como gas portador y detector

de ionización de llama (134). Ester Zylber-katz y col. determinan lidocaína y bupivacaína en plasma utilizando una columna empaquetada con OV-17 sobre Gas-Chrom Q, operando a temperatura programada, con N₂ como gas portador y detector de ionización de llama (135). B.E. Pape y col. comparan los resultados obtenidos en la determinación de lidocaína en suero mediante inmunoensayo enzimático y cromatografía gas-líquido en una columna de SE-30 en gas-Chrom Q con detector de ionización de llama (136).

David W. Holt y col. en 1979 determinan lidocaína y mexiletina en plasma o suero en una columna empaquetada con Apiezon L y KOH sobre Chromosorb W AW que opera a 212 °C, N₂ como gas portador y detector de ionización de llama (137). David W. Holt y col. determinan lidocaína en muestras de miocardio canino después de la digestión utilizando una columna empaquetada con OV-101 sobre Supelcoport que opera a 195 °C, con N₂ como gas portador y detector de ionización de llama (138). Satya P. Jindal y col. determinan lidocaína en muestras ilícitas de cocaína, utilizando una columna de vidrio silanizada con diclorodimetilsilano en tolueno, empaquetada con OV-17 sobre gas-Chrom Q, y que opera a 200°C, con detector de ionización de llama (139). Sumain Jain y col. comparan los resultados obtenidos en la determinación de lidocaína en plasma mediante inmunoensayo enzimático y cromatografía gas-líquido en una columna empaquetada con SP-2250 en Supelcoport que opera a 235 °C, con N₂ como gas portador y detector de N de perla caliente (140).

R.T. Sane y col. en 1980, determinan lidocaína en preparaciones farmacéuticas mediante una columna empaquetada con OV-225 en Chromosorb W que opera a 230 °C, con N₂ como gas portador y detector de ionización de llama (141). B. Mandrou y col. determinan lidocaína entre otros compuestos en preparaciones farmacéuticas utilizando una columna empaquetada con SE-30 sobre Chromosorb W a 180 °C, o una columna empaquetada con OV-17 sobre Chromosorb W HP a 220 °C, y N₂ como gas portador y detector de ionización de llama (142).

J.R. Sharman en 1981, determina lidocaína entre otros compuestos en extractos de plasma en una columna de vidrio empaquetada con OV-225, lavado en ácido y Chromosorb W silanizado, y con detección termoiónica (143). J. Gal y col. determinan lidocaína en plasma de sangre humano utilizando una columna

empaquetada con OV-1 sobre Gas-Chrom Q que opera a 200 °C, con N₂ como gas portador y detector de N (144). Michael E. Kruczek determina lidocaína en suero utilizando una columna empaquetada con Gas-Chrom Q revestida con OV-17, con He como gas portador y detector de ionización de llama N-P (145). Pai-Chie Chen-Chow y col. determinan lidocaína y benzocaína en medio miristato de isopropilo utilizando una columna de OV-17 en Gas-Chrom Q que opera a 212 °C, con He como gas portador y detector de ionización de llama, o una columna de OV-17 en Gas-Chrom Q, a 180 °C, con He como gas portador y detector N-P (146). G. Desch y col. determinan lidocaína, bupivacaína y etidocaína en plasma utilizando una columna de OV-17 en Chromosorb W AW-DMCS con detector de ionización de llama, separando también los dos principales metabolitos de lidocaína (147). F.E. Karch y col. determinan lidocaína y mepivacaína en plasma humano mediante cromatografía gas-líquido tal y como lo describen Kline y Martin (148) pero utilizando una columna con temperatura programada. Stephen D. Gettings y col. determinan lidocaína y tocainida en sangre, suero y plasma en una columna de vidrio silenizada empaquetada con OV-101 en Supelcoport, con N₂ como gas portador y detector de ionización de llama (149).

Darrell R. Abernethy y col. en 1982, determinan lidocaína en plasma humano, previa extracción, mediante una columna de vidrio empaquetada con OV-101 en Chromosorb W HP que opera a 190 °C, con He como gas portador y detector de N-P (150). John D. Hawkins y col. determinan lidocaína y sus metabolitos en plasma utilizando una columna empaquetada con Carbowax y KOH en Gas-Chrom Q, con N₂ como gas portador y detector de N-P (151). Artur T. Kacprowicz determina lidocaína en plasma en una columna empaquetada con Carbowax y KOH en Chromosorb, con N₂ como gas portador y detector de ionización de llama (152). H. Breuer determina lidocaína en plasma de gato en una columna de vidrio empaquetada con Chromosorb W HP revestida de OV-17 que opera a 190 °C, con N₂ como gas portador y detector de ionización de llama (153).

Barry Levine y col. en 1983, realizan el análisis de lidocaína en sangre y tejidos sin interferencia de otras drogas, en una columna de OV-101 sobre Supelcoport, operando a 300 °C, con detector N-P (154). La determinación de lidocaína y norlidocaína la llevan a cabo Y. Liu y col. utilizando una columna empaquetada con OV-1 sobre Gas-Chrom Q, He como gas portador y detección por espectrometría de

masas; paralelamente, se utiliza una columna empaquetada similar a la anterior, He como gas portador y detector de N-P (155).

R. Willis y col. en 1984, determinan simultáneamente lidocaína y sus metabolitos dietilados utilizando una columna de SP-2250 en Supelcoport que opera a 200 °C, con He como gas portador y detector de N-P (156). I.B. Comparini y col. determinan simultáneamente lidocaína y otras drogas mediante cromatografía gaseosa de alta resolución utilizando una columna capilar de vidrio empaquetada con SE-40, con H₂ como gas portador y detección de ionización de llama (157).

Z. Qiao y col. en 1986, determinan lidocaína en sangre mediante una columna empaquetada PEG-20M, que operaba a 200 °C, N₂ como gas portador y detector de ionización de llama (158). D.E. Coyle y col. determinan lidocaína, meperidina, bupivacaína, etidocaína, mepivacaína y metadona utilizando una columna de vidrio empaquetada con OV-11 en Chromosorb W AW-DMCS con He como gas portador y detector de N-P (159). R.T. Coutts y col. determinan lidocaína y sus metabolitos utilizando una columna capilar DB-17, He como gas portador y detección por espectrometría de masas (160). S. Stavchansky y col. determinan clorhidrato de lidocaína en una columna de vidrio silanizado empaquetada con OV-17 sobre Gas-Chromosorb Q, que operaba a 200 °C, con N₂ como gas portador y detector de ionización de llama (161). G. Karlaganis y col. determinan lidocaína mediante una columna de vidrio revestida con SE-54, He como gas portador y detección por espectrometría de masas (162). La determinación de lidocaína en orina de rata la llevan a cabo R.T. Coutts y col., en una columna capilar con DB-1 que operaba con programa de temperatura, o una columna de DB-1701 con programa de temperatura, y detección, en ambos casos, por ECD-⁶³Ni, y posterior identificación por espectrometría de masas de impacto electrónico e ionización química con isobutano como gas reactivo (163).

T. Fujii y col. en 1988, determinan lidocaína en suero mediante cromatografía de gases con detector de ionización de superficie, encontrándose una alta sensibilidad en compuestos que contienen átomos de nitrógeno fácilmente ionizables (164). B. Vetter y col. determinan lidocaína en plasma humano a través de una columna de QF-1 sobre Gas-Chrom Q, que operaba a 170 °C, N₂ como gas portador y detector de ionización de llama (165). P. Banditt y col. determinan lidocaína en materiales biológicos por cromatografía de gases a 180 °C utilizando una columna de

Chromosorb 20 M empaquetada con OV-101, N₂ como gas portador y detector de ionización de llama (166).

C.G. Godoy y col. en 1989, determinan lidocaína en plasma en una columna capilar con SE-54 CB, que operaba a 215 °C con detector termoiónico de N-P (167).

H. Arimoto y col. en 1991, determinan lidocaína en suero humano en una columna capilar de CBP-5, operando a 260 °C, con He como gas portador y detector de ionización de superficie (168).

M. Lorec y col. en 1994 determinan simultáneamente lidocaína, bupivacaína y sus dos principales metabolitos en una columna de metilsilicona entrelazada revestida con HP1, a 270 °C, He como gas portador y detector de N-P (169). La lidocaína, entre otros compuestos que contienen oxígeno, la determinan C. Webster y col. en una columna revestida con fenilmetilsilicona entrelazada HP-5 con He como gas portador y detector de emisión atómica (170).

M. Franke y col. en 1996, determinan lidocaína, diazepam, nordiazepam, propoxifeno y norpropoxifeno en suero por cromatografía de gases, previa extracción con microondas, utilizando una columna DB-17 y detector de N-P (171). P. Demedts y col. determinan lidocaína, bupivacaína y sus dos principales metabolitos mediante cromatografía de gases en una columna de sílice fundido HP-5 y detector de N-P (172).

S.S. Rossi y col. en 1997, determinan lidocaína y sus metabolitos en plasma de ratas utilizando una columna revestida con HP-1 que operaba con He como gas portador y detector de N-P (173).

ELECTROFORESIS

H. Kleun en 1982, determina cualitativa y cuantitativamente clorhidrato de lidocaína, procaína y tetracaína mediante isotacoforesis capilar utilizando detector U.V. (174).

Z. Chmela y col. en 1985, determinan lidocaína y otros anestésicos mediante isotacoforesis capilar utilizando una columna analítica (175).

ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN MOLECULAR

E.G. Feldmann y col. en 1959 aplican el método descrito por Sass y colaboradores para la determinación de lidocaína previa extracción con tolueno (176).

S.A. Ismaiel y col. en 1975, determinan lidocaína en preparaciones farmacéuticas mediante el uso de verde de bromocresol y medida de la extinción de la solución a 625 ± 5 nm frente a un blanco preparado simultáneamente (177).

D.M. Shingbal y col. en 1976 determinan clorhidrato de lidocaína mediante la obtención de un precipitado formado a partir de esta droga con reineckato de amonio, que es determinado colorimétricamente (178).

Ezzat H. Girgis y col. en 1977, determinan lidocaína en preparaciones farmacéuticas por formación de un complejo con verde de bromocresol y medida de la absorbancia a 420 nm, siendo aumentada la sensibilidad del método por la adición de hidróxido de tetrabutyl amonio y medida de la absorbancia a 625 nm (179).

E. Vinkler y col. en 1978, determinan lidocaína utilizando una solución alcalina de cobre (II) con formación de un color azul cuyo máximo de absorción es de 600 nm (180).

E.H. Girgis y col. en 1979, determinan lidocaína en preparaciones farmacéuticas utilizando verde de bromocresol, extracción con cloroformo y medida de la absorbancia de la solución de cloroformo a 420 nm, siendo mejorada la sensibilidad por adición de hidróxido tetrabutylamonio y medida de la absorbancia a 625 nm (181).

R.T. Sane y col. en 1982, determinan lidocaína y otros compuestos utilizando la extracción de pares iónicos de las drogas con negro de Solocromo T, azul oscuro de Solocromo o negro de Fast Sulphon FF en cloroformo y midiendo su absorbancia a 520 nm (182).

J. Lemli y col. en 1983, determinan lidocaína entre otros compuestos utilizando la formación de pares iónicos con $\text{Co}(\text{SCN})_2$ y las drogas, que es determinado posteriormente por espectrofotometría a 625 nm (183).

H. Li en 1987, determina clorhidrato de lidocaína mediante espectrofotometría de tercera derivada entre 230 y 300 nm, sin interferencia de ametocaína (184). Y Zhou determina clorhidrato de lidocaína en inyecciones mediante espectrofotometría a 262 nm (185). P. Dubois y col. determinan lidocaína entre otros compuestos presentes en preparaciones farmacéuticas mediante espectrofotometría reflectante de IR cercano entre 1100 a 2500 nm (186).

M.I. Arufe-Martínez y col. en 1989, determinan simultáneamente lidocaína y cocaína utilizando espectrofotometría de segunda derivada entre 220 y 320 nm (187).

L. Zivanovic y col. en 1994, determinan lidocaína y carticaína mediante la formación de un par iónico de estas drogas con azul de bromofenol y verde de bromocresol, posterior extracción en cloroformo y medida de la absorbancia de la fase orgánica a 410 nm y 415 nm (188). A. Cruz y col. determinan lidocaína, procaína y cocaína en muestras ilegales de cocaína mediante espectrofotometría de segunda derivada entre 380 y 220 nm (189).

A.V. Pavlova y col. en 1995, determinan clorhidrato de lidocaína mediante espectrofotometría UV de cuarta derivada utilizando un ancho de rendija de 2 nm, una velocidad de registro de 60 nm/min y el espectro se registra desde 200 a 400 nm (190).

FLUORIMETRÍA O FOSFORIMETRÍA

James Theron en 1973, determinan una mezcla de clorhidrato de lidocaína y epinefrina mediante la separación de ambas drogas utilizando columnas de ceolita y medida posterior por espectrofluorimetría a 262 nm (191).

H. Tarlin y col. en 1976, determinan epinefrina en clorhidrato de lidocaína mediante análisis fluorimétrico automatizado (192).

M. Syoyama y col. en 1984, determinan lidocaína, entre otras drogas, por formación de pares iónicos fluorescente compuesto por lumogalión en presencia de Al^{3+} con estas drogas (193).

R. Huang y col. en 1987 determinan lidocaína, atropina y xilazina en sangre mediante fosforimetría utilizando una longitud de onda de excitación de 302nm (194).

ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN ATÓMICA

R. Montero y col. en 1988, determinan indirectamente lidocaína, ametiocaína y procaína en preparaciones farmacéuticas mediante la formación de un complejo de Co^{2+} con cada una de estas drogas y posterior medida de la concentración de cobalto (II) mediante AAS a 240 nm (195).

Nerin y col. en 1991, determinan lidocaína de forma indirecta mediante espectrofotometría de absorción atómica extrayendo el par iónico formado por lidocaína-tetratiocianato de cobalto con 1,2-dicloroetano y medida de Co en la fase orgánica a 240.7 nm en una llama aire-acetileno (196). G. Lei y col. determinan lidocaína, clorhidrato de ametocaína y procaína en suero humano de forma indirecta por formación de un par iónico entre las drogas y $Zn(SCN)$, posterior extracción con 1,2-dicloroetano y determinación de Zn en la fase orgánica mediante llama aire-acetileno (197).

M.A. El-Ries y col. en 1994, determinan indirectamente lidocaína en preparaciones farmacéuticas por formación de un complejo de cobre (II)-lidocaína y medida de la concentración de cobre mediante AAS a 324 nm en una llama de aire-acetileno (198).

ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

G.A. Neville en 1969, caracteriza los clorhidratos de lidocaína, de procaína y dimetocaína a través de sus espectros de RMN (199).

ESPECTROMETRÍA DE MASAS.

W.A. Garland y col. en 1974, determinan lidocaína y quinidina en plasma mediante espectrometría de masas (200).

S.D. Nelson y col. en 1977, determinan lidocaína y varios de sus metabolitos en plasma y en orina mediante esta técnica por medida de la altura de pico de los espectros obtenidos (201).

T. Fujii y col. en 1994, determinan lidocaína y otras drogas mediante espectrometría de masas de superficie de ionización orgánica, con una fuente térmica de iones con emisión de renio, previa separación de las drogas por cromatografía de gases, utilizando una columna empaquetada con CBP-5 a 260 °C y He como gas portador (202).

MÉTODOS ELECTROQUÍMICOS

POLAROGRAFÍA

H. Hoffmann en 1971 y 1972, determina polarográficamente aminas terciarias como sus correspondientes aminóxidos, estudia la influencia de la adsorción en la reducción de aminóxidos y se analiza lidocaína en preparados farmacéuticos (203)(204).

POTENCIOMETRÍA

M.S. Ionescu y col. en 1985, preparan electrodos selectivos de membrana para la determinación potenciométrica de la lidocaína, basados en la incorporación de una membrana líquida, consistente en un par iónico de lidocaína-dopicrilamina en nitrobenceno o una membrana matriz de PVC conteniendo un par iónico de lidocaína/ácido dinonilnaftalenesulfónico (205). S. Zommer-Urbanska y col. determinan cromonar, hexobendina, lidocaína, procainamida y todralazina en tabletas y ampollas mediante potenciometría directa con electrodo selectivo de cloruro frente a SCE o mediante valoración potenciométrica con electrodo selectivo-Ce o electrodo indicador de plata (206).

ANÁLISIS DE INMUNOENSAYO

W.W. Stargel y col. en 1979 comparan la determinación de lidocaína en sangre y plasma después del contacto con tubos de vidrio y tubos Vacutainer utilizando un equipo de reactivos EMIT (207). Derek P. Lehane y col. adaptan un equipo EMIT disponible comercialmente con el uso de un analizador Gilford System 3500 de tal forma que pueden ser analizadas 42 muestras en una hora; los resultados obtenidos para la lidocaína tienen buena correlación con los obtenidos mediante cromatografía de gases basados en el método de Hucker y Stauffer (208).

Phillip R. Bach y col. en 1980, almacenan reactivos reconstituidos para el ensayo de la lidocaína, procaïnámida, N-acetilprocaïnámida, gentamicina y teofilina a temperatura ambiente de 23-24 °C con el fin de estudiar la estabilidad de las curvas patrones preparadas para equipos EMIT (209).

Brian E. Pape en 1981 demuestra que la reactividad cruzada para mepivacaína es inversamente proporcional a la concentración de lidocaína en el análisis de ésta con el uso de un equipo EMIT (210).

Vinod P. Shah y col. en 1982, estudian que la presencia de plástico en tapones, especialmente en los tubos de Vacutainer, causan desplazamiento de algunas drogas de sitios enlazados a proteínas, redistribución en eritrocitos y distorsión de la concentración aparente de la droga en el plasma; las drogas afectadas incluyen entre otras la lidocaína (211).

F. Quattrocchi y col en 1983, observan que el uso de tubos Becton-Dickinson para la separación de muestras de suero y sangre causa significativas pérdidas de lidocaína pentobarbitona y fenitoina (212). J.E. Gorsky determina lidocaína en suero mediante inmunoensayos heterogéneos EMIT (213).

S. Vozeň y col. en 1985, describen un paquete software para el cálculo de parámetros farmacocinéticos en la base de determinaciones de una o más drogas (214). R.C. Parish y col. realizan la determinación de lidocaína en plasma y suero mediante un equipo de ensayo EMIT que fue modificado para determinar lidocaína entre 30 y 150 µg. Se comprueba que este ensayo fue comparable en sensibilidad a la

determinación por HPLC para medidas de bajas concentraciones de lidocaína en plasma y suero (215). K.V. Ponganis y col. estudian los factores que afectan (fuerza iónica de la solución tampón, temperatura de almacenamiento de las muestras, edad del suero, etc.) a la unión de la lidocaína a proteínas de suero en la determinación de la fracción libre de esta droga en suero (216).

A.J. Sedman y col. en 1986, usan el sistema Abbot TDx para determinar la concentración aparente de suero de carbamazepina, digoxin, gentamicin, lidocaína, fenobarbitona, fenitoin, quinidina, ácido valproico y vancomicina en plasma de pacientes con fallos renales que no recibieron estas drogas. No se observan interferencias de sustancias endógenas. Este método es considerado más apropiado para plasma de pacientes con fallos renales que otros procedimientos de inmunoensayos (217). J.E. Devine (218), evalúa el uso del tubo integrado Corvac separador de suero para el análisis de drogas, mediante la adición de lidocaína, quinidina o teofilina a muestras de sangre, y se investiga el tiempo de exposición y volumen de sangre, por medio de tubos separadores SST; el análisis de todas las drogas se realizó mediante EMIT. K. Di Gleria y col. determinan lidocaína en muestras de suero mediante el uso de ensayo Sistema de Nivel Libre EMIT y por cromatografía gas-líquido, previamente separadas por ultrafiltración y diálisis. La determinación de lidocaína en matrices biológicas también puede llevarse a cabo mediante inmunoensayo amperométrico por medio de ferroceno homogéneo (219).

M.J. Green en 1987, presenta una revisión con 18 referencias sobre inmunoensayos potenciométricos y amperométricos de enzimas y se discute un inmunoensayo electroquímico para lidocaína (220). E. Bertol y col. comparan la determinación de lidocaína mediante inmunoensayo de polarización fluorescente, inmunoensayo enzimático y cromatografía gaseosa de alta resolución. Se obtienen buenas correlaciones entre los resultados conseguidos por los tres métodos (221). L.M. López y col. comprueban mediante ensayos EMIT si la exposición de muestras de sangre al caucho de los tapones de los tubos Vacutainer influyen en los resultados obtenidos para la lidocaína. Se observa también que la concentración de lidocaína no se afecta por la presencia del anticoagulante citrato sódico (222).

Y.H. Caplan y col. en 1988, analizan sangre para ensayos de lidocaína, fenitoin y fenobarbitona mediante inmunoensayo de polarización de fluorescencia de Abbott TDX sin pretratamiento, dilución ni centrifugación (223).

2.2.4. DIBUCAÍNA Y LIDOCAÍNA

En este apartado se recogen los métodos analíticos que determinan simultáneamente dibucaína y lidocaína.

VOLUMETRÍA

R. Popovic y col. en 1967 determinan los clorhidratos de lidocaína y dibucaína utilizando valoración coulombimétrica a 50 mA (224).

Zakrzewski Zdzislaw en 1970 determinan los clorhidratos de dibucaína y prilocaína utilizando varios ácidos arenosulfónicos y amarillo de dimetilo como indicador (225). El mismo autor prepara complejos de clorhidratos de dibucaína y lidocaína con 17 ácidos arenosulfónicos, utilizando los valores de puntos de fusión y contenido en nitrógeno para identificar estas drogas (226).

A.A. Abou-Ouf y col. en 1979, determinan dibucaína y lidocaína entre otros compuestos en preparaciones farmacéuticas mediante valoración potenciométrica directa con 1,3-dibromo-5,5-dimetilhidantoina, valoración directa con el uso de rojo de metilo, naranja de metilo, indigo o amaranto como indicadores, valoración con el uso de yoduro- $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ en medio ácido y valoración fotométrica a 345 nm (227).

CROMATOGRAFÍA

CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA

Kinzo Nagasawa y col. en 1972, determinan dibucaína y lidocaína mediante el uso de capas de Avicel SF-sulfato de celulosa, alcohol isobutílico saturado con ácido fórmico como eluyente y detección con reactivo de Dragendorff (228).

Wanda Weglowska y col. en 1973, separan dibucaína y lidocaína presentes en preparaciones farmacéuticas mediante placas de Silica Gel G, benceno/etil eter/tricloroetileno/ácido acético anhidro como eluyentes y localización de las bandas mediante $Ce(SO_4)_2$ en H_2SO_4 (229).

G. Guebitz y col. en 1978, determinan lidocaína y dibucaína mediante cromatografía de capa fina de alta resolución, utilizando placas de Silica Gel 60 F₂₅₄, y una mezcla de etil eter/benceno/ciclohexano/dietilamina, identificado espectrofotométricamente (230).

CROMATOGRAFÍA DE GASES

N.D. Greewood y col. en 1974, determinan dibucaína y lidocaína utilizando una columna de vidrio empaquetada con OV-1 en Chromosorb G AW-DMCS que opera a 235 °C, con N₂ como gas portador y detector de ionización de llama (231).

M. Culea y col. en 1989, determinan simultáneamente dibucaína, lidocaína, ametocaína y procaína en hígado de rata y tejidos cerebrales utilizando una columna de vidrio de SE-30 con temperatura programada, H₂ como gas portador y detector de ionización de llama (232).

X.Y. Hu en 1994, determinan dibucaína, lidocaína, bupivacaína y procaína en plasma utilizando una columna de SE-54 y detector de ionización de llama (233).

ELECTROFORESIS

V. Jokl y col. en 1961, estudian algunos compuestos como clorhidrato de dibucaína y lidocaína mediante electroforesis utilizando un papel Whatman nº 4, a 20 V por cm. y reactivo Drangendorff's en la detección y separación de los compuestos (234).

ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN MOLECULAR

M. Fayez y col. en 1981, determinan lidocaína, dibucaína, procaína y ametocaína utilizando azul de bromofenol, extracción en trietanolamina y medida de la absorbancia a 600 nm (235).

2.2.5. PRILOCAÍNA Y LIDOCAÍNA

La prilocaína y lidocaína se han determinado de forma simultánea empleando las técnicas siguientes:

CROMATOGRAFÍA

CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA

H.A. Adams y col. en 1989 determinan prilocaína, lidocaína, bupivacaína, etidocaína y mepivacaína en una columna C₁₈, con fase móvil de acetonitrilo/tampón fosfato y detección UV a 210 nm. (236).

J. Klein y col. en 1994, determinan simultáneamente prilocaína, lidocaína y o-toluidina, metabolito de la prilocaína, en una columna de Octyl 1B, con fase móvil de acetonitrilo/tampón fosfato y detección a 210 nm (237).

CROMATOGRAFÍA DE GASES

G. Svinhufvud y col. en 1965, realizan una estimación de prilocaína y lidocaína, en materiales biológicos utilizando una columna de Gas-Chrom P empaquetada con nitrilosilicona XF 1112, He como gas portador y detector de ionización de llama (238).

J.D. Cameron en 1974, determina prilocaína y lidocaína entre otros compuestos en plasma utilizando una columna de vidrio empaquetada con OV-17 en Gas-Chrom Q que opera a 205 °C, Ar como gas portador y detector de nitrógeno (239).

Akira Asada en 1979, determina mezclas de prilocaína, lidocaína, etidocaína, mepivacaína y bupivacaína en una columna de OV-17 en Shimalite W, N₂ como gas portador y detector de ionización de llama (240).

Yara Cretella y col. en 1981, determinan prilocaína, lidocaína o etidocaína en sangre utilizando una columna de vidrio empaquetada con Chromosorb W y que opera a 175 °C, con N₂ como gas portador y detector de ionización de llama (241).

M. Prat y col. en 1986, determinan prilocaína, lidocaína, etidocaína, mepivacaína y bupivacaína simultáneamente utilizando una columna de OV-17 en Chromosorb W AW-DMCS, con N₂ como gas portador y detector de ionización de llama (242)

M. Bjork y col. en 1990, determinan simultáneamente prilocaína, lidocaína, mepivacaína, bupivacaína y ropivacaína en plasma en una columna de metil silicona entrelazada, He como gas portador y detector N-P (243).

ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN MOLECULAR

J.F. De Freitas en 1977, determina tolicaína y los clorhidratos de prilocaína, lidocaína, mepivacaína y pirrocaína mediante la formación de un complejo de cobre en medio alcalino, cuyos máximos de absorción se caracterizaron siendo a 570 nm para el clorhidrato de lidocaína y a 610 nm para el clorhidrato de prilocaína (244).

2.3. TÉCNICAS ELECTROANALÍTICAS UTILIZADAS EN ESTA MEMORIA

Las técnicas utilizadas para llevar a cabo el estudio de los anestésicos tratados en este trabajo han sido polarografía de muestreo de corriente o tast y diferencial de pulsos, voltamperometría con EPC, voltamperometría de barrido lineal, voltamperometría cíclica, coulombimetría y cronocoulombimetría

A continuación se recogen de forma resumida, los criterios teóricos utilizados al aplicar dichas técnicas, con el fin de que las conclusiones obtenidas en este trabajo encuentren una adecuada justificación.

2.3.1 INFLUENCIA DEL pH

Tanto la forma como la posición y la intensidad de una onda polarográfica o voltamétrica pueden depender en gran medida de la concentración de los protones del medio, por ello la primera variable estudiada fue la influencia del pH.

Este estudio permite conocer si los protones intervienen o no directamente en el proceso electroquímico, en cuyo caso tanto $E_{1/2}$ como E_p variarán con el pH, así como, si la especie electroactiva participa en equilibrios en que los protones intervenga directamente y que hagan variar su concentración, en cuyo caso variarán la I_i y la I_p con el pH.

Los iones hidrógeno participan en la reducción de muchas especies orgánicas. Puesto que la reducción a menudo implica la adición de electrones a una molécula neutra para formar una especie reducida, que a su vez es una molécula neutra, son necesarios entonces un número igual de iones hidrógeno para asegurar la neutralidad.



Debido a que los iones hidrógeno están presentes, se hace necesario incluir en la ecuación de Nerst la concentración de ion hidrógeno para la reacción.

$$E = E^\circ + \frac{RT}{nF} \ln \frac{C_{\text{ox}} C_{\text{H}^+}^n}{C_{\text{red}}}$$

(estrictamente hablando deberían ser utilizados términos de actividad y no de concentración, pero en las soluciones diluidas utilizadas no hay prácticamente diferencia).

En el caso general, donde intervienen n electrones y p iones hidrógenos el potencial de onda media será:

$$E_{1/2} = E_{\text{const}} + \frac{RT}{nF} \ln C_{\text{pH}^+}$$

o bien

$$E_{1/2} = E_{\text{const}} - \frac{pRT}{nF} \text{pH}$$

La ecuación de Nerst sólo se aplica para sistemas termodinámicamente reversibles. En procesos termodinámicamente irreversibles la ecuación se modifica añadiendo la constante α cuyo valor oscila entre 0 y 1.

$$E_{1/2} = E_{\text{const}} - \frac{pRT}{\alpha nF} \text{pH}$$

En ambos sistemas podemos observar que el potencial depende del pH de la solución. Así el potencial de onda media para la reducción u oxidación de las especies en la solución cambia a razón constante por unidad de pH, dependiendo del número de iones hidrógenos y electrones en el paso determinante de potencial. En la reducción el potencial se mueve hacia valores más negativos con el incremento de pH y en consecuencia el proceso de reducción se vuelve más dificultoso mientras que en oxidación el potencial de onda media también se mueve hacia valores más negativos de potencial, con lo cual los procesos de oxidación se hacen más sencillos.

Muchas reducciones u oxidaciones electroquímicas se realizan en varios pasos. A menudo el primero de estos pasos es el paso determinante de la velocidad e incluso el paso determinante del potencial. Los siguientes pasos son mucho más rápidos y no afectan al potencial aunque sí a la altura de la onda. La variación del potencial de onda media con el pH es determinada por el número de iones hidrógeno que participan antes y en el paso determinante de potencial.

Mediante el estudio del efecto del pH sobre el comportamiento polarográfico de un compuesto se pueden obtener conclusiones sobre la reversibilidad del paso

determinante de potencial. La pendiente de la recta del potencial de onda media frente al pH viene dada por $2,303 pRT/nF$ para procesos reversibles y $2,303 pRT/\alpha nF$ para procesos irreversibles, donde p y n son el número de protones y electrones que participan en la reacción. Sustituyendo los valores de las constantes universales obtenemos $0,059 p/n$ V para procesos reversibles y $0,059 p/\alpha n$ V para procesos irreversibles. Lo cual quiere decir múltiplos enteros simples de 59 mV para procesos reversibles y no enteros para irreversibles. Esta regla sólo se aplica en el paso determinante de potencial.

Es muy importante que la solución esté adecuadamente tamponada si los iones hidrógenos participan en la electrólisis. Para la reducción en un medio no tamponado la electrólisis consumiría iones hidrógenos, reduciendo su concentración y elevando el pH en la superficie del electrodo. Esto produciría oscilaciones en el potencial de la reacción. El resultado sería una onda alargada y muy poco definida. Sin embargo, si la solución contiene un tampón a altas concentraciones ($>0,01$ mol/l) el pH permanece constante en la superficie del electrodo. Esto da lugar a una onda bien definida.

Hasta ahora se ha descrito la variación del potencial con el pH para especies individuales presentes en la solución. Sin embargo debido a los cambios de pH, a los cambios en la naturaleza de las especies presentes en la solución, y a las reacciones ácido/base que tienen lugar, el analito se encuentra en diferentes estados de protonación.

Las diferentes formas protonadas de un compuesto individual pueden variar considerablemente en su comportamiento polarográfico. A menudo sólo una forma protonada es electroactiva. En otros casos una segunda forma protonada es también electroactiva pero a un potencial muy diferente. En algunos casos la forma electroinactiva puede ser rápidamente protonada o desprotonada a la forma electroactiva en un paso rápido antes del paso electrolítico, aumentando la onda pero a un potencial distinto. En otros casos la forma electroinactiva permanece totalmente inactiva y la onda desaparece cuando el pH se ajusta a un valor donde esta forma es dominante. Algunas veces el mecanismo de reducción u oxidación pueden cambiar con el pH.

La relación entre pH y el comportamiento polarográfico de los compuestos orgánicos pueden ser muy complicadas, y es en muchos casos concernientes a la Química Física o a la Química Orgánica más que a Química Analítica. Varias consideraciones son importantes para el químico analítico (245):

- Tanto las muestras como las soluciones estándar deben ser siempre tamponadas al mismo valor de pH.

- Las regiones de valores de pH próximas a valores de pK siempre deben ser evitadas si es posible. La altura de la onda puede ser dependiente del pH cerca del valor de pK. Aún peor, las reacciones de protonación y desprotonación antes de la electrólisis a menudo introducen algo de carácter cinético a la onda en la región próxima al valor de pK. La componente cinética proporciona una alta dependencia con la temperatura y da lugar a pérdidas en la reproducibilidad.

- La elección de pH puede ser utilizada para aumentar la selectividad. Se puede elegir una determinada región de pH en base a que las sustancias interferentes no sean electroactivas en ella.

- Una última consideración es la electrólisis del electrolito soporte que limita el rango útil de potencial de trabajo. Así pues se puede elegir un pH en base a que a ese valor la onda estudiada no se solape o quede parcialmente oculta por la onda ilimitada del electrolito soporte.

- El pH de la solución puede afectar también la estabilidad del analito.

2.3.1. TIPOS DE CORRIENTES EN POLAROGRAFÍA

Existen varios tipos de corrientes que se han encontrado en polarografía, aunque muchas de ellas no tienen interés analítico. La más común y útil es la corriente controlada por difusión (246).

La señal polarográfica consiste generalmente en una onda. A potencial bajo no existe corriente. Cuando el potencial se va incrementando, se llega a sobrepasar un

potencial umbral y el proceso electrolítico comienza. Este valor umbral es conocido también como potencial de deposición. Cuando el potencial crece aún más la corriente aumenta exponencialmente. Sin embargo, no puede crecer continuamente y por ello algunos procesos deben limitar su crecimiento. De esta forma, el crecimiento en la corriente se estacionará formando una meseta, dando lugar así a la típica onda polarográfica. La corriente que fluye en la meseta es conocida como corriente límite y se mide físicamente como la altura de la onda.

Diferentes procesos pueden ser los responsables de limitar el crecimiento de la corriente. Esencialmente, la electrólisis puede ocurrir tan rápidamente como la especie electroactiva llega a la superficie del electrodo. Por ejemplo, cuando el crecimiento está limitado por la velocidad máxima a la cual el analito difunde al electrodo, se habla de corriente límite controlada por difusión. Cuando la velocidad de la reacción química limita la corriente electrolítica, se habla de corriente cinética.

Debido a que algunos tipos de corriente son más útiles o más reproducibles que otros es necesario siempre identificar el tipo de corriente.

2.3.1.1. CORRIENTE FARADAICA.

Este término es general para todas las corrientes causadas por la electrólisis de especies químicas en solución. Recibe este nombre debido a que la electrólisis obedece a la ley de Faraday.

El término es utilizado para diferenciar las corrientes de electrólisis de otras corrientes, tales como la corriente capacitativa, en la que la celda actúa como un componente electrónico. A continuación se exponen los tipos de corriente faradaica.

2.3.1.1.1. CORRIENTE DE DIFUSIÓN

Este tipo de corriente es generalmente el más útil desde el punto de vista analítico. Mientras otros tipos de corriente, en ocasiones, encuentran aplicación analítica, la corriente de difusión es generalmente la corriente más reproducible.

En un proceso controlado por difusión la corriente límite es controlada por la velocidad a la cual las especies difunden a la superficie del electrodo. Como la electrólisis continúa, la solución en la superficie del electrodo reduce su contenido en especies electroactivas que deben difundir hacia el electrodo. Esto produciría una caída en el valor de la corriente, pero la gota del electrodo de mercurio crece en área superficial, poniéndose en contacto de solución fresca. Esto causaría un incremento en la corriente con el tiempo durante la vida de la gota. Estos dos factores opuestos se combinan dando lugar a un sobrecrecimiento en la corriente durante el tiempo de vida de la gota.

Por combinación de estos dos factores, Ilkovic obtuvo la ecuación que lleva su nombre. Para un proceso de reducción catódico:

$$I_d = 708 nD^{1/2} m^{2/3} t^{1/6} C_{ox}$$

En polarografía clásica DC se mide la corriente media durante el tiempo de vida de la gota. Para la corriente media I_d la ecuación de Ilkovic será:

$$I_d = 607 nD^{1/2} m^{2/3} t^{1/6} C_{ox}$$

siendo I_d la corriente límite de difusión en μA , n el número de Faradays de electricidad por mol de reactivo, D_{ox} es el coeficiente de difusión de la especie electroactiva en cm^2/s , m es la velocidad de flujo del mercurio en mg/s , t es el tiempo de gota en s y C_{ox} es la concentración de reactivo en $mmol/l$. La única diferencia entre las dos ecuaciones es la constante 607 y 708.

En estas ecuaciones n y D son constantes características de la especie electroactiva y m y t son parámetros del electrodo que pueden ser tomados como constantes. De esta forma, la corriente límite de difusión es proporcional a la concentración de la especie electroactiva en la solución. Por tanto, la corriente límite de difusión medida como la altura de la onda puede ser usada como una herramienta analítica para determinar la concentración de las especies.

2.3.1.1.2. CORRIENTE DE MIGRACIÓN

Esta corriente es causada por la aceleración de los iones hacia el electrodo debido a la atracción electrostática. No existe relación lineal con la concentración. Generalmente, se suprime la participación de la especie electroactiva en la corriente de migración, por la adición de un exceso de un electrolito soporte inactivo que será el responsable del transporte de la corriente a través de la disolución.

2.3.1.1.3. CORRIENTES CINÉTICAS

Hay muchos tipos de corrientes cinéticas. En todas ellas la especie electroactiva no se encuentra originariamente presente en la solución, pero se forma como producto de una reacción química en la solución o en algunos casos en la superficie del electrodo.

La velocidad de la reacción química es crucial. Una reacción extremadamente lenta mostraría una lenta elevación en la onda convencional controlada por difusión. Sin embargo, si la velocidad de la reacción química es más rápida que la velocidad de difusión, la corriente límite será controlada por difusión. Para que aparezca una onda cinética, la velocidad de la reacción química debe ser relativamente rápida pero suficientemente más lenta que la velocidad de la difusión.

Para reacciones simples de primer orden la corriente cinética viene dada por:

$$I_k = 528nm^{2/3}t^{2/3}D^{1/2}k_f^{1/2}K^{1/2}C_{ox}$$

donde k_f es la constante de velocidad (s^{-1}) de la reacción química precedente y K es la constante de equilibrio de la reacción.

La ecuación arriba expuesta sólo es aplicable a reacciones simples de primer orden que preceden a la electrólisis. Los detalles pueden variar para cinéticas más complejas.

Aunque las corrientes cinéticas presentan relación lineal con la concentración no son útiles para aplicaciones analíticas debido a que estas corrientes son muy sensibles a la temperatura y al pH, es difícil obtener suficiente reproducibilidad y exactitud incluso con el mejor control de temperatura disponible.

2.3.1.1.4. CORRIENTES DE DIFUSIÓN CON CONTRIBUCIÓN CINÉTICA.

Este tipo también implica una reacción química que precede al paso electroquímico. En este caso la velocidad de la reacción química es más similar a la velocidad de la difusión y el factor limitante en la corriente es una combinación de difusión y de la velocidad de la reacción química.

2.3.1.1.5. CORRIENTES CATALÍTICAS

Estas son también corrientes cinéticas pero ahora la reacción química o la electrólisis regenera la sustancia original de la que depende la altura y posición de la onda puesto que esta sustancia no es consumida por la electrólisis, ésta actúa como un catalizador y entonces la onda que genera se conoce con el nombre de onda catalítica.

Desafortunadamente las corrientes catalíticas, aunque son a menudo mayores que las corrientes de difusión, tienen generalmente una pobre reproducibilidad y por ello tienen un uso muy limitado en química analítica. La corriente de difusión pueden también incrementarse mediante un componente catalítico. Esto, generalmente, es una molestia. Cuando una onda es catalítica, por su alta sensibilidad, se deben de tomar muchos cuidados con las condiciones de pH, temperatura, etc. para asegurar un nivel aceptable de reproducibilidad. Las ondas controladas por difusión con componente catalítico es mejor que se eviten.

2.3.1.1.6. FENÓMENOS Y ONDAS DE ADSORCIÓN

Los fenómenos de adsorción se presentan en muy variadas formas, muchas de ellas como interferencias en aplicaciones analíticas. El químico analítico que utiliza

polarografía debe siempre considerar el peligro de los agentes tensoactivos que pueden presentarse en la solución.

Las especies que causan algún efecto de adsorción pueden ser especies electroactivas de interés o algunas otras especies en la solución. Algunas especies pueden dar diferentes fenómenos de adsorción, de la misma forma que una especie química es capaz de existir en diferentes formas adsorbidas.

2.3.1.1.6.1. Preondas y postondas de adsorción

Este es el fenómeno de adsorción más reproducible y simple. Con algunas ondas polarográficas, la principal onda de difusión es acompañada por una onda pequeña que precede o sigue a la onda de altura constante. Esta es una preonda o postonda de adsorción, algunas veces conocidas como preonda o postonda de adsorción de Brdicka.

La preonda es causada por la adsorción en la superficie del electrodo de algo del material electroactivo. Si la forma adsorbida es más fácil de reducir entonces será reducida a potenciales más bajos que el resto de la forma electroactiva en la solución. La forma adsorbida formará así una preonda a potenciales más positivos (para reducción o procesos catódicos) que la onda principal. Puesto que hay sólo un limitado número de lugares disponibles para la adsorción, estos estarán completamente ocupados por encima de una cierta concentración. Así la altura de la preonda de adsorción llegará a ser constante después de una cierta concentración y si se incrementa la concentración por encima de este valor, sólo aumentará la altura de la onda principal.

La corriente correspondiente a la preonda de adsorción ha sido, en efecto, tomada de la onda principal. Es la suma de la corriente de la onda principal y de la preonda que es proporcional a la concentración de la especie electroactiva. La suma está controlada por difusión.

Las postondas de adsorción son similares a las preondas pero son causadas por la adsorción del producto de la electrólisis, o cuando la adsorción de la forma electroactiva original produce dificultad para que esta forma se reduzca.

Generalmente la adsorción de las especies libera energía que está disponible para el paso de electrólisis, haciendo más fácil la reducción de las especies. Las pre- y postondas de este tipo pueden ser toleradas muy a menudo, con tal que la suma de las corrientes de la preonda y de la onda principal sea tomada como señal analítica. Estas se pueden evitar mediante elección de diferentes disolventes o electrolitos soportes. El uso de un surfactante para suprimir la preonda no es muy aconsejable.

2.3.1.1.6.2. Máximos polarográficos

Hay dos clases de máximos polarográficos. Los máximos de primera clase se encuentran como una continuación de la parte elevada de la onda y son generalmente puntiagudos. Los máximos de segunda clase son redondeados montículos que se encuentran en la meseta de la onda. Ambos son fenómenos de adsorción. Los máximos de primera clase se cree que se forman debido al rápido flujo de la solución al electrodo. Los máximos de segunda clase son generalmente observados a concentraciones de electrolito soporte superiores a 0.2 M. Su dependencia con la presión de mercurio es característica, y estos se incrementan cuando se aumenta la altura de la columna de mercurio.

En el análisis polarográfico es a menudo necesario suprimir estos máximos para permitir obtener la medida precisa de la corriente límite. Para tales propósitos la adición de gelatina o tensoactivos pueden ser utilizados, pero debido a que las ondas algunas veces se distorsionan con el uso de altas concentraciones de estas sustancias se recomienda emplearlas en las concentraciones más bajas posibles.

2.3.1.2. *CORRIENTE CAPACITATIVA*

La corriente capacitativa no es una corriente faradaica, es decir, no es debida a una reacción electroquímica. Es debida a la actuación de la interfase electrodo/disolución como un condensador. Cuando se aplica un potencial negativo al electrodo, la superficie del mercurio queda cargada negativamente. A esta capa de iones negativos se opone otra de iones positivos de la solución. Estas dos capas de carga actúan como dos placas de un condensador.

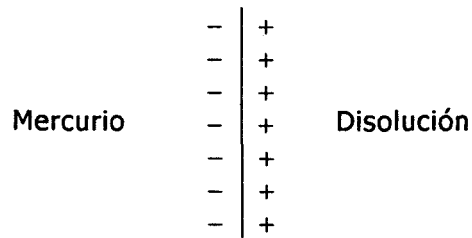


Figura 2.3.2.1.

La doble capa de Helmholtz en la superficie del electrodo.

El potencial entre la doble capa de la interfase electrodo/disolución, (el potencial del electrodo) depende directamente de la densidad de carga en la superficie de mercurio. Al imponer un potencial en el electrodo una corriente debe fluir para crear esta doble capa eléctrica. Esta es la corriente capacitativa.

Si se impone un potencial constante en un electrodo sólido de tamaño determinado la corriente capacitativa desaparece una vez formada la doble capa eléctrica. Sin embargo, la gota en el electrodo de gotas de mercurio está creciendo en área superficial a medida que se forma, por tanto se requiere nuevas cargas para conservar constante la densidad de carga. Por tanto, la corriente capacitativa continua fluyendo.

Esta corriente capacitativa no forma generalmente ondas discretas propias, pero si es la mayor causa de corrientes residuales. La corriente capacitativa aumenta cuando lo hace el potencial. Es una señal de fondo, una fuente de ruido, y como tal el mayor factor limitante en la sensibilidad en la polarografía DC.

Un condensador eléctrico contiene un medio dieléctrico entre las dos placas. Las especies adsorbidas en el electrodo pueden actuar como un medio dieléctrico. Por tanto, la corriente capacitativa varía algunas veces con la adsorción en el electrodo y no es predecible sólo a partir de las características del electrodo.

La corriente capacitativa decrece con el tiempo de goteo, siendo su intensidad proporcional a $1/t^{1/3}$.

2.3.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS DIFERENTES TIPOS DE PROCESOS ELECTRÓDICOS.

Para distinguir entre los diferentes tipos de procesos electródicos, se toma como guía la dependencia de la corriente límite con la presión de mercurio, dependencia del pH, concentración del tampón, tiempo de goteo, temperatura y concentración de la sustancia activa polarográficamente (247).

Cuando se estudia la dependencia de la intensidad límite con la altura del depósito de mercurio, la altura que debe ser considerada es la denominada altura corregida, h_{corr} , la cual representa la altura del depósito de mercurio que contribuye efectivamente a determinar las características del capilar y que es el valor medio de la altura del depósito de mercurio, h , menos la altura equivalente a la presión que se opone a la salida del mercurio por el capilar debido a la tensión superficial, h_b , la cual viene dada por la expresión:

$$h_b = \frac{3.1}{(mt)^{1/3}}$$

Por tanto, la altura del depósito de mercurio queda definida por:

$$h_{\text{corr}} = h - h_b = h - \frac{3.1}{(mt)^{1/3}}$$

En polarografía clásica la ecuación de Ilkovic muestra que para corrientes limitadas por difusión, la intensidad límite es proporcional a $h_{\text{corr}}^{1/2}$, mientras que en polarografía *tast*, I_l es proporcional a $h_{\text{corr}}^{2/3}$. Así, aplicando la técnica de polarografía *tast*, el criterio para dilucidar la naturaleza de la corriente límite de reducción es calcular el valor de la pendiente de la recta que se obtiene al representar $\log I_l$ frente a $\log h_{\text{corr}}$. Si la corriente límite está controlada por difusión dicha pendiente debe tener un valor próximo a 0,67. Las corrientes cinéticas son independientes de h , y las corrientes de adsorción son directamente proporcionales a h . Las corrientes catalíticas pueden ser función lineal de h , independientes de h o poseer una función intermedia.

En la figura 2.3.3.1 se observa distintas representaciones de intensidad límite frente a la altura corregida según el tipo de corriente.

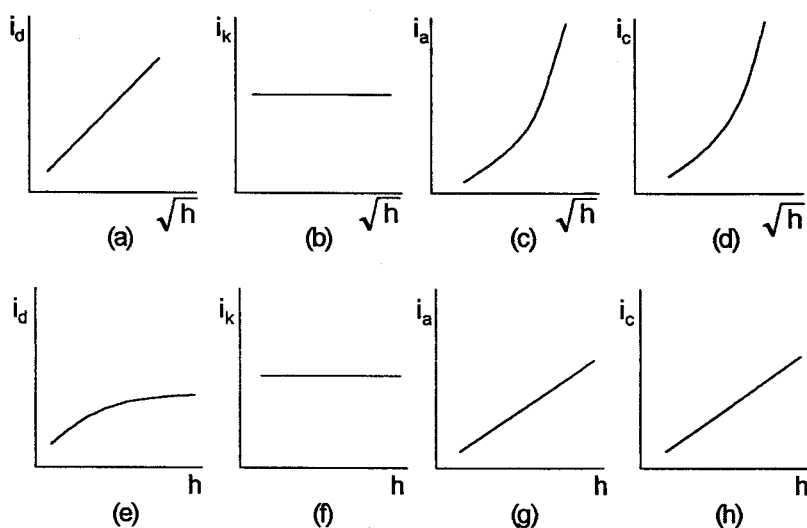


Figura 2.3.3.1.
Estudio del tipo de corriente polarográfica según el efecto de la presión de mercurio (h).

El pH del electrolito soporte a menudo influye en las corrientes cinéticas y, por supuesto en la corriente catalítica de hidrógeno.

Mientras que las corrientes de difusión y de adsorción son normalmente independientes de la concentración del tampón, las corrientes cinéticas (en algunas ocasiones) y las catalíticas son a menudo función de la concentración y de la composición del tampón.

La relación entre el tiempo de goteo de mercurio en el electrodo marca también diferencias según la naturaleza del proceso electrodo. En el caso de que la corriente sea de difusión o cinética la intensidad límite aumenta de forma proporcional a $t^{1/6}$. En las corrientes de difusión con contribución cinética la intensidad límite es proporcional a un valor de t entre $2/3$ y $1/6$. La intensidad límite de las corrientes catalíticas presentan la misma dependencia con el tiempo de vida de la gota que las de difusión y cinéticas aunque también presentan otras dependencias.

El estudio de la influencia de la temperatura sobre la corriente límite también es importante para determinar el tipo de corriente que controla un proceso de reducción polarográfica. En general, las corrientes de tipo difusivo presentan un

coeficiente de temperatura cuyos valores oscilan entre 1 y 2 %, mientras que las corrientes catalíticas y cinéticas muestran valores sustancialmente mayores. Por otra parte, las corrientes de adsorción presentan un comportamiento peculiar, ya que normalmente permanecen constantes a medida que aumenta la temperatura, hasta alcanzar ésta un cierto valor, a partir del cual las ondas tienden a desaparecer paulatinamente. Esto es debido a que los coeficientes de adsorción son inversamente proporcionales a la temperatura.

El coeficiente de temperatura viene dado por la ecuación:

$$T_{\text{coeff}}\% = \left[\frac{2.303}{T_2 - T_1} \log \frac{I_2}{I_1} \right] \cdot 100$$

donde I_2 es la corriente límite a la temperatura T_2 e I_1 es la corriente límite a la temperatura T_1 . Siempre T_2 debe ser mayor que T_1 .

El tipo de función que relaciona la corriente límite con la concentración de la sustancia electroactiva es otro de los criterios que proporciona información sobre la naturaleza de aquella. En la figura 2.3.3.2 se encuentran representadas gráficamente las distintas formas que muestra la dependencia de la intensidad límite con la concentración de la especie electroactiva dependiendo de la naturaleza del proceso electródico. Si se trata de un proceso controlado por difusión, manteniendo constante la altura de la columna de mercurio y la temperatura, existe una relación lineal entre la concentración y la intensidad de corriente. Cuando el proceso es cinético o catalítico, la altura de la onda es menor o mayor, respectivamente, que si el proceso fuera de difusión, siendo lineal en el proceso catalítico. Si el fenómeno producido es de adsorción, la relación es lineal hasta que se produce la saturación, momento a partir del cual la intensidad se mantiene constante aunque se siga aumentando la concentración de la sustancia.

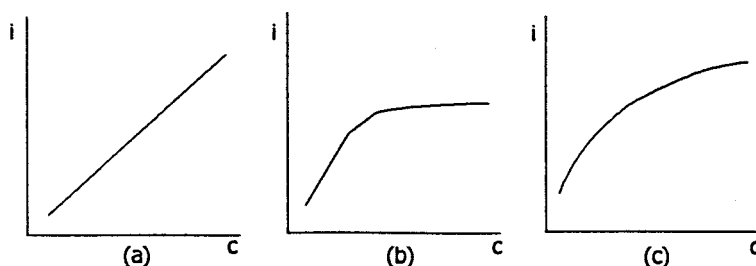


Figura 2.3.3.2.

Tipos de dependencia entre la intensidad límite y la concentración de la especie electroactiva según la naturaleza del proceso electroquímico, (a) proceso controlado por difusión, (b) proceso de adsorción, (c) proceso cinético.

En la tabla 2.3.3.1 se resumen las características de los tipos más importantes de corrientes.

Tabla 2.3.3.1.
Criterios para distinguir los distintos tipos de corrientes.

Tipo de corriente	Símbolo	h	C	Tampón	pH	$\frac{1}{I} \frac{dI}{dT}$
Difusión	I_d	$k \cdot h^{1/2}$	$k \cdot C$	Independiente	Independiente	1.6%
Cinética	I_k	$k \cdot h^0$	$k \cdot C$	Dependiente	Dependiente	5-20 %
Adsorción	I_a	$k \cdot h$	Lim.	Independiente	Independiente	Diferente
Catalítica	I_{cata}	Diferente	Lim.	Dependiente	Dependiente	

Nota: Lim. significa la corriente que alcanza un valor límite con el incremento de la concentración de la sustancia.

2.3.3. CRITERIOS DE REVERSIBILIDAD DEL PROCESO POLAROGRAFICO.

Las reacciones electroquímicas se suelen clasificar, según su velocidad, en reversibles, irreversibles y cuasirreversibles. Las primeras son aquellas en las que el equilibrio termodinámico se alcanza prácticamente de forma instantánea, a cualquier potencial, debido a que la velocidad de transferencia electrónica es alta. Para estas reacciones, las variaciones de la corriente con el potencial reflejan la posición cambiante del equilibrio, que viene descrita por la ecuación de Nerst. En el otro extremo se encuentran las reacciones totalmente irreversibles, tan lentas que sólo se desplazan ligeramente hacia el equilibrio durante la vida de la gota de mercurio. Para estas reacciones, la relación entre la corriente y el potencial viene controlada por la velocidad del proceso de transferencia electrónica y por la forma en que éste se

encuentra afectado por el potencial del electrodo. Entre estos extremos existe una clase intermedia de reacciones que reciben el nombre de cuasirreversibles.

Existe una gran variedad de criterios para establecer la reversibilidad e irreversibilidad del proceso electródico según se empleen técnica tast, PPD o CV.

2.3.1.3. ESTUDIO DE LA REVERSIBILIDAD DE LOS PROCESOS MEDIANTE POLAROGRAFÍA TAST.

Los criterios son:

A) Análisis logarítmico de la función intensidad-potencial.

Se debe tener en cuenta que, para los sistemas más comúnmente estudiados, una onda catódica reversible, a 25 °C, está definida por la ecuación:

$$E = E_{1/2} - \left(\frac{0.059}{n} \right) \log \left(\frac{I}{I_1 - I} \right)$$

donde E es el potencial aplicado (en V), $E_{1/2}$ es el potencial de onda media (en V), n es el número de Faradays de electricidad por mol de reactivo, I es la corriente producida para cada potencial aplicado (en μA), e I_1 es la corriente límite de difusión (en μA). En consecuencia, la representación de -E frente al $\log(I/I_1 - I)$, para un proceso reversible controlado por difusión, a 25 °C, debería dar como resultado una recta con una pendiente igual a 0.059/n (248).

La ecuación de una onda polarográfica, catódica e irreversible, para un proceso controlado por difusión, a 25 °C, viene dada por la siguiente expresión:

$$E = E_{1/2} - \frac{0.0542}{\alpha n_a} \log \left(\frac{I}{I_1 - I} \right)$$

siendo,

$$E_{1/2} = \frac{0.05915}{\alpha n_a} \log \left(\frac{1.349 k_f^0 \tau^{1/2}}{D^{1/2}} \right)$$

donde I es la corriente medida al final de la vida de la gota; n_a es el número de electrones implicados en la etapa controlante de la velocidad del proceso de reducción; τ es el tiempo de gota; D es el coeficiente de difusión de la especie electroactiva; α es el coeficiente de transferencia electrónica y k_f^0 la constante de velocidad para la reacción electroquímica a $E=0$ en la escala de potencial utilizada.

La representación de $-E$ frente al $\log I/I_L - I$ dará como resultado una recta con una pendiente igual a $0.0542/\alpha n_a$ y una ordenada en el origen igual a $E_{1/2}$. A partir de estos valores obtenidos en el diagrama logarítmico correspondiente, se puede determinar los parámetros cinéticos αn_a y k_f^0 .

B) Determinación del valor de $E_{3/4} - E_{1/4}$.

El criterio de $E_{3/4} - E_{1/4}$ se basa en la medida de los valores de $E_{1/4}$ y $E_{3/4}$ en los polarogramas registrados por polarografía estática, siendo estos los potenciales para los cuales la corriente es igual a $1/4$ y $3/4$, respectivamente, de la corriente límite de difusión. Si se aplica la ecuación de Nerst para ambos potenciales a 25°C se tiene que:

$$E_{3/4} - E_{1/4} = -\frac{0.0564}{n} V$$

Por tanto, un proceso electroquímico reversible debe cumplir esta expresión.

Un proceso irreversible tendrá que cumplir que:

$$|E_{3/4} - E_{1/4}| > \frac{0.059}{n} V$$

2.3.1.4. ESTUDIO DE REVERSIBILIDAD MEDIANTE PPD.

Los criterios son:

A) Criterio de R. L. Birke (249).

Es el más usual. Se realiza un barrido anódico y otro catódico tomando amplitudes de pulso positivas y negativas, respectivamente. Está basado en la diferencia entre los potenciales catódico y anódico, así como en las diferencias entre las intensidades de pico anódica y catódica.

En resumen, las posibilidades que pueden observarse al aplicar este criterio, así como las conclusiones que pueden deducirse en cada caso son:

- *Transferencia de carga reversible*

$$E_p^c - E_p^a = |\Delta E|$$

$$\frac{I_p^a}{I_p^c} = 1$$

- *Transferencia de carga cuasireversible*

$$E_p^c - E_p^a \approx |\Delta E|$$

$$\left| \frac{I_p^a}{I_p^c} \right| < 1 \quad \text{para} \quad \alpha \geq 0.5$$

$$\left| \frac{I_p^a}{I_p^c} \right| > 1 \quad \text{para} \quad \alpha < 0.5$$

- *Transferencia de carga irreversible*

$$E_p^c - E_p^a \approx |\Delta E|$$

$$\left| \frac{I_p^a}{I_p^c} \right| < 1$$

B) Determinación de la anchura de medio pico $W_{1/2}$ cuando $\Delta E=0$ (250).

En un sistema reversible se cumple que:

$$W_{1/2} = 3.52 \frac{RT}{nF}$$

Según esto, cuando se opera a 25 °C, se puede asignar a $W_{1/2}$ valores de 90.4, 45.2, 30.1 y 22.6 mV (extrapolando a $\Delta E=0$) a procesos con intercambios electrónicos 1, 2, 3 y 4 electrones respectivamente. Para procesos irreversibles, los valores de $W_{1/2}$ son superiores a los indicados.

C) Variación de E_p con ΔE (251).

Para procesos reversibles se cumple:

$$E_p = E_{1/2} - \frac{\Delta E}{2}$$

y por tanto E_p variará con ΔE hacia valores menos catódicos, y con pendiente -0.5, al aumentar la amplitud de pulso.

D) Relación de I_p y $\sigma-1/\sigma+1$ (251).

En la expresión del valor de intensidad de pico por polarografía diferencial de pulso:

$$\Delta I_{max} = nFAC_{ox} \sqrt{\frac{D}{\pi t_r}} \frac{\sigma-1}{\sigma+1}$$

$$\text{siendo } \sigma = \exp\left(\frac{nF}{RT} \frac{\Delta E_p}{2}\right)$$

Se puede observar que manteniendo constante los demás valores, la intensidad de pico debe ser función lineal de $\sigma-1/\sigma+1$, para un proceso reversible.

$$\Delta I_{max} = f\left(\frac{\sigma-1}{\sigma+1}\right)$$

2.3.1.5. ESTUDIO DE LA REVERSIBILIDAD MEDIANTE VOLTAMPEROMETRÍA CÍCLICA Y DE BARRIDO LINEAL.

La voltamperometría de barrido lineal y la voltamperometría cíclica, que puede considerarse una extensión de la anterior, son especialmente útiles para el conocimiento de mecanismos de procesos redox, gracias a su capacidad para registrar de forma rápida la evolución del sistema al aplicar una variación de potencial lineal con el tiempo, en un amplio intervalo.

Para un proceso de oxidación sencillo la forma típica de las curvas I-E obtenidas mediante la aplicación de un barrido lineal de potencial se representa en la figura 2.3.4.3.1.

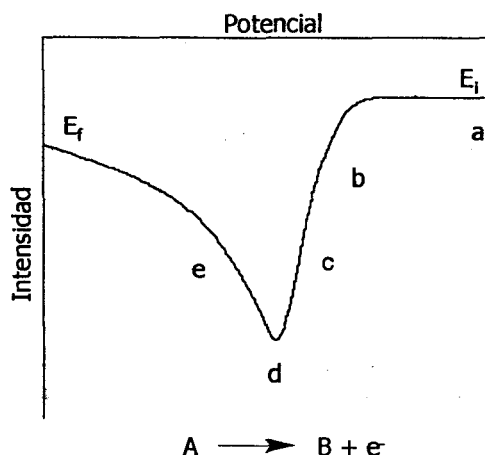


Figura 2.3.4.3.1
Forma general de las curvas I-E en voltamperometría de barrido lineal.

En el punto "a" donde se inicia el barrido, el potencial aplicado no es suficiente para que se produzca la oxidación a velocidad apreciable. A medida que el potencial se desplaza hacia valores más positivos, aproximándose al potencial de oxidación de A, tiene lugar la reacción a velocidad creciente hasta alcanzar el máximo de intensidad ("d") para un potencial cercano al potencial de semionda del sistema A/B. A partir de ese momento la corriente decrece debido a la disminución de la concentración en las proximidades del electrodo. Llegado al punto "e" se alcanza el control difusivo del proceso de oxidación, con lo cual la corriente decrece según $t^{-1/2}$.

Para un proceso electroquímico de tipo reversible, la intensidad máxima o intensidad de pico, I_p , viene dada por la ecuación de Randles-Sevcik (252)(253) confirmada posteriormente por Nicholson (254):

$$I_p = kn^{3/2}AD_0^{1/2}C_0V_b^{1/2}$$

donde k es la constante de Randles-Sevcik, n es el número de electrones intercambiados, A el área del electrodo de trabajo, D_0 es el coeficiente de difusión de la especie electroactiva a dilución infinita y V_b es la velocidad de barrido de potencial y C_0 la concentración de la especie electroactiva.

Si se utiliza un electrodo de trabajo de gota suspendida de mercurio y para procesos reversibles, el potencial de pico obtenido mediante barrido lineal (E_p) se relaciona con el potencial de semionda ($E_{1/2}$), según la ecuación:

$$E_p = E_{1/2} - \frac{0.0285}{n}$$

e, igualmente, se cumple:

$$E_{p1/2} = E_{1/2} + \frac{0.0285}{n}$$

donde $E_{p1/2}$ es el potencial de semipico.

Para procesos irreversibles, la ecuación que proporciona el valor de I_p incluye el coeficiente de transferencia de carga α , y fue deducida por Delahay (255).

$$I_p = 2.99 \times 10^5 n(n_a \alpha)^{1/2} A D_o^{1/2} C_o V_b^{1/2}$$

donde n_a es el número de electrones intercambiados en el paso determinante de la velocidad de reacción.

En estas circunstancias E_p resulta dependiente de la velocidad de barrido, y viene dado por la expresión:

$$E_p = E_o + \frac{RT}{n_a \alpha F} \left[-0.78 + \ln \frac{k_1}{D_o^{1/2}} - \frac{1}{2} \ln \left(\frac{n_a \alpha F}{RT} V_b \right) \right]$$

donde E_o es el potencial normal del sistema y k_1 es un factor relacionado con la constante heterogénea de velocidad de la reacción de transferencia de electrones.

Para procesos irreversibles o cuasireversibles puede determinarse $n_a \alpha$ según la expresión:

$$E_p - E_{p1/2} = \frac{0.048}{n_a \alpha}$$

De las expresiones que nos dan el valor de I_p , se deduce que para procesos controlados por difusión, tanto reversibles como irreversibles, I_p es proporcional a $V_b^{1/2}$, lo cual constituye un criterio útil para establecer la naturaleza del proceso en estudio.

En cuanto a la voltamperometría cíclica, que consiste simplemente en la aplicación de un barrido lineal de potenciales de forma cíclica o triangular sobre un electrodo estacionario, se rige igualmente por las expresiones anteriores ya que se trata simplemente de una extensión de la técnica DC de barrido lineal.

Una característica importante de esta técnica es que los productos originados en un barrido pueden, a su vez, ser electroactivos dando lugar a señales en el barrido opuesto, dado que se trabaja sobre electrodo estacionario y en tiempos relativamente cortos. Es una característica especialmente importante en la elucidación de mecanismos de electrodo y en estudios previos a la aplicación de técnicas de preconcentración.

Las técnicas voltamperométricas, cíclicas y de barrido lineal, aportan diversos criterios para evaluar la reversibilidad de los procesos electroquímicos. Así:

1) Variación de E_p con V_b .

- Proceso reversible: E_p no depende de V_b .
- Proceso cuasireversible: E_p se desplaza catódicamente al aumentar V_b .
- Proceso irreversible: E_p se desplaza catódicamente $30/n_a\alpha$ mV cuando V_b aumenta en un factor de 10.

2) Cociente entre las intensidades de pico anódico y catódico $\left(\frac{I_p^a}{I_p^c}\right)$.

- Proceso reversible: $\frac{I_p^a}{I_p^c} = 1$ e independiente de V_b .

- Proceso cuasireversible: $\frac{I_p^a}{I_p^c} = 1$ sólo si $\alpha=0.5$.

- Proceso irreversible: no aparece señal en el barrido inverso.

3) Diferencia entre los potenciales de pico anódico (E_p^a) y catódico (E_p^c).

- Proceso reversible: $E_p^a - E_p^c = \frac{0.059}{n}$ mV a 25 °C.

- Proceso cuasireversible: $E_p^a - E_p^c$ se aproxima a 60 mV para valores pequeños de V_b y aumenta al hacerlo V_b .

- Proceso irreversible: no aparece señal en el barrido inverso.

2.3.4. DETERMINACIÓN DEL COEFICIENTE DE DIFUSIÓN DE LA ESPECIE ELECTROACTIVA.

El coeficiente de difusión de una especie electroactiva se puede determinar a partir de las curvas de calibrado obtenidas por polarografía tast, teniendo en cuenta que las corrientes máximas de difusión vienen dadas por la ecuación:

$$I_1 = 708 n D^{1/2} C m^{2/3} \tau^{1/6}$$

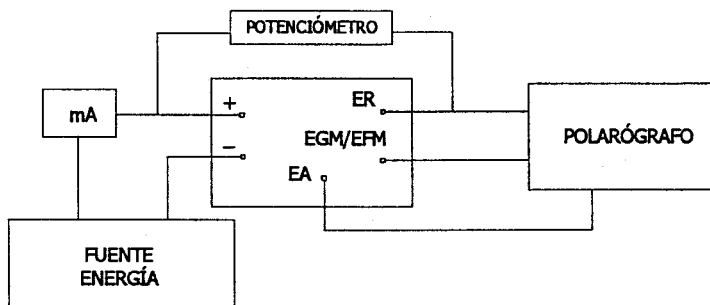
El método consiste en representar la corriente de difusión en función de la concentración de la especie electroactiva, manteniendo constantes los demás parámetros. A partir del valor obtenido para la pendiente de la recta, P , se calcula el valor del coeficiente de difusión, D , mediante la relación:

$$D = \left[P / (708 n m^{2/3} \tau^{1/6}) \right]^2$$

2.3.5. DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE ELECTRONES TRANSFERIDOS EN LA REACCIÓN ELECTRÓDICA.

No es recomendable aplicar simplemente la ecuación de Ilkovic para el cálculo del número de electrones debido a que el valor exacto del coeficiente de difusión es, generalmente, desconocido, en las condiciones utilizadas en polarografía (a bajas concentraciones). Además, sería necesario usar la forma ampliada de la ecuación de Ilkovic (256) para obtener un valor preciso. De este modo, la operación habitual es comparar la altura de la onda objeto de estudio, con la altura para una sustancia en la misma concentración molar y con el mismo electrolito soporte. El número de electrones transferido para la última sustancia debe ser conocido bajo las condiciones utilizadas. La sustancia patrón debe ser una entidad químicamente bien definida, y la forma molecular y el peso molecular deberían ser aproximadamente iguales a la molécula objeto de estudio. Es conveniente, que tanto la sustancia patrón como la sustancia estudiada tengan los mismos grupos funcionales. Se asume que los coeficientes de difusión de ambas sustancias son prácticamente idénticos, y es aconsejable utilizar más de una sustancia patrón.

La coulombimetría y la cronocoulombimetría (257) son también utilizadas para la determinación del número de electrones transferidos. En estos métodos la cantidad de electricidad necesaria para reducir una cantidad determinada de sustancia es medida en el potencial de la corriente límite, controlado por un potencióstato. Los métodos coulombimétricos no son muy exactos, y a veces parte de las reacciones ocurren cuando electrodos de superficie constante son utilizados en lugar del electrodo de gotas de mercurio. Puede causar problemas una insuficiente separación entre el espacio anódico y el catódico. Los métodos coulombimétricos son, de este modo, mejor utilizados en sistemas, donde n es igual a 1 o 2, pero para mayor número de electrones, la decisión es generalmente difícil. Para llevar a cabo este método se utilizó el montaje siguiente:



utilizando el polarógrafo Metrohm Polarecord E-506 y el Stand Metrohm 663 VA y siendo el electrodo de trabajo un charco de mercurio.

El método más directo para conocer el número de electrones transferidos en la electroreducción u electroxidación de un compuesto orgánico, es la identificación del producto de la electrólisis con electrodo de gotas de mercurio. Conociendo el número de uniones en la sustancia objeto de estudio y en el producto de la electrólisis se obtiene una estimación del número de electrones necesarios para esta transformación.

CAPÍTULO III
ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO
POLAROGRÁFICO Y DETERMINA-
CIÓN DE DIBUCAÍNA POR
POLAROGRAFÍA DIFERENCIAL DE
PULSO.

En una serie de estudios previos sobre el comportamiento polarográfico de la dibucaína en forma de clorhidrato(2-butoxi-2-dietilaminoetil-4-amido carboxiquinolina) se pudo observar que presenta dos ondas catódicas a potenciales de -0.805 y -1.130 V aproximadamente, como puede verse en la figura 3, en donde se encuentran representados los polarogramas tast y PPD correspondientes a una muestra que contenía 10 ml de clorhidrato de dibucaína 10^{-3} M, 5 ml de tampón fosfato de pH 2.3 y agua Milli-Q hasta completar un volumen de 25 ml. Una vez preparada la muestra, ésta se trasvasó a la celda polarográfica donde se le hizo pasar una corriente de nitrógeno puro durante 10 minutos, tras lo cual se dispusieron las condiciones necesarias para la medida y el registro de los polarogramas por tast y PPD. El barrido se realizó desde -0.70 a -1.350 V, utilizándose una amplitud de pulso de -50 mV en el caso de PPD y un tiempo de goteo de 1 s. Estas condiciones experimentales de medida se mantienen en experiencias posteriores, indicándose cuando se efectúa algún cambio.

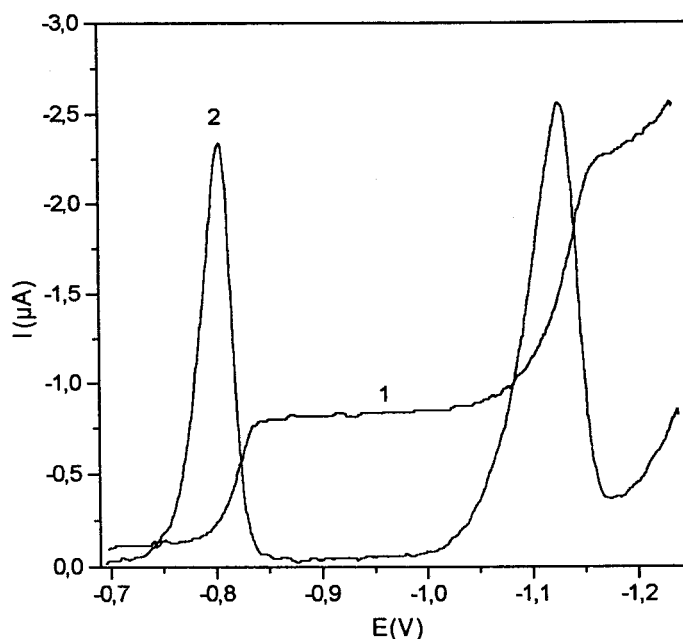


Figura 3.
Reducción polarográfica de la dibucaína a pH 2.3. 1) Polarografía tast,
2) Polarografía diferencial de pulso.

3.1. INFLUENCIA DEL pH.

Para llevar a cabo este estudio se prepararon muestras de distintos valores de pH, entre 1.0 y 11.0, añadiendo volúmenes variables de ácido fosfórico 1 M e hidróxido sódico 1 M hasta un total de 5 ml en todos los casos, 10 ml de solución de dibucaína 10^{-3} M y agua milli-Q hasta 25 ml. Posteriormente se registran los polarogramas entre -0.650 a -1.350 V.

En las tablas 3.1.1 y 3.1.2 se recogen los valores obtenidos de potencial e intensidad de pico a distintos valores pH para las ondas de reducción de la dibucaína.

Tabla 3.1.1.
Efecto del pH sobre E_p en polarografía diferencial de pulso sobre una disolución de dibucaína 4×10^{-4} M; t_p 1 s; ΔE -50 mV; V_b 5 mV/s.

pH	E_p (V) Onda I	E_p (V) Onda II
1.2	-0.715	-1.065
2.6	-0.830	-1.150
3.1	-0.860	-1.180
4.4	-0.935	-1.315
5.1	-0.950	-1.350
5.8	-0.980	-1.410
6.5	-0.995	-1.455
6.7	-1.020	-1.505
7.5	-1.050	-1.575
8.1	-1.065	-1.600
8.8	-1.100	-1.610
10.4	-1.200	
11.1	-1.270	

Tabla 3.1.2.
Efecto del pH sobre I_p en polarografía diferencial de pulso sobre una disolución de dibucaína 4×10^{-4} M; t_p 1 s; ΔE -50 mV; V_b 5 mV/s.

pH	I_p (μ A) Onda I	I_p (μ A) Onda II
1.2	-2.431	-1.727
2.6	-2.471	-2.344
3.1	-2.420	-2.289
4.4	-1.843	-3.147
5.1	-1.833	-3.271
5.8	-1.830	-2.361
6.7	-1.820	-2.255
7.5	-1.817	-2.305
8.1	-1.757	-2.209
8.8	-0.979	-0.730
10.4	-0.319	
11.1	-0.262	

La representación de potencial de pico frente al pH aparece en la figura 3.1.1. En ella se puede observar que a medida que el pH aumenta, el potencial de pico de ambas ondas crece hacia valores más negativos. Esta dependencia del pH con el potencial de pico muestra claramente que los protones participan directamente en los procesos de reducción.

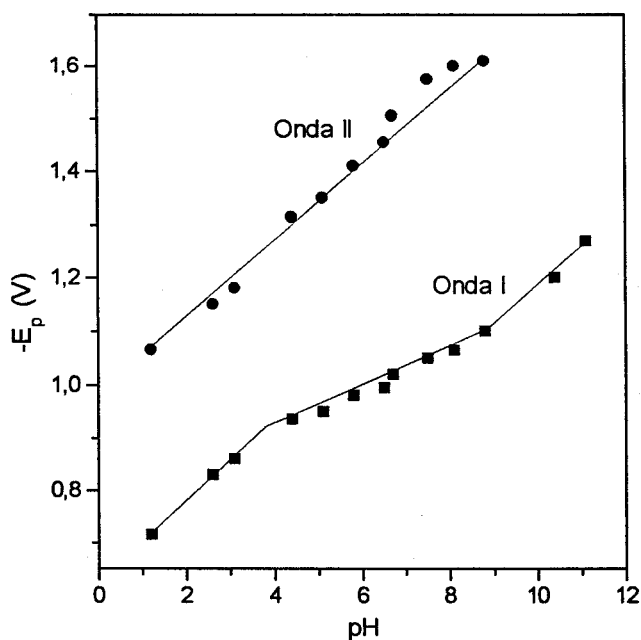
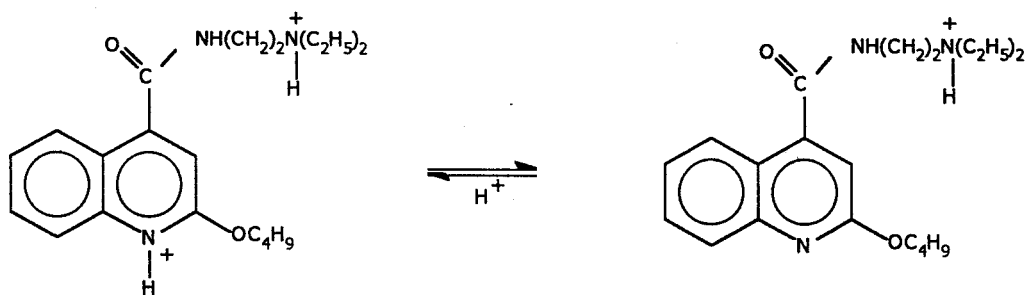
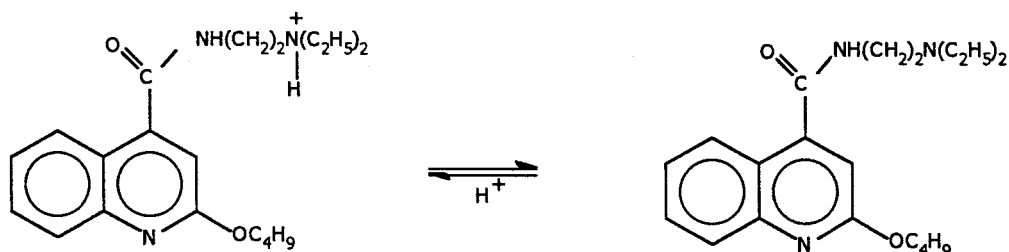


Figura 3.1.1.
Variación del potencial de pico con respecto al pH para las dos ondas de reducción de la dibucaína.

Así mismo se observan para la primera onda tres segmentos rectilíneos que se cortan a pH 3.9 y 8.8, confirmando, por tanto, la presencia de un equilibrio ácido-base con valores de pK_a próximos a 3.9 y 8.8. El segmento cuyos valores de pH son menores a 3.9 indica una doble protonación de la dibucaína en solución localizada en los nitrógenos quinolínicos y amínico, siendo posteriormente ambos grupos reducidos en el electrodo de mercurio, según el proceso:



En la misma figura se aprecia como el segmento cuyos valores de pH son mayores a 8.8 sugiere la protonación de la dibucaína en la solución, resultando un grupo amino protonado que es reducido en el electrodo de mercurio.



Las pendientes de los tres tramos lineales para la primera onda son de -63.7 mV entre pH 1.0 y 3.9, de -76.1 mV entre pH 3.9 y 8.8 y de -45.9 mV entre pH 8.8 y 11.0. El segundo pico desaparece a valores de pH superiores a 8.8 y la pendiente de la recta que resulta al representar el potencial de pico frente al pH es de -78.9 mV entre pH 1.0 y 8.8.

En la figura 3.1.2 se encuentra la representación de la intensidad de pico frente al pH. La altura del primer pico alcanza un valor máximo en el rango de pH 1.0 a 3.0. A pH mayores de 8.0 la altura decrece a medida que el pH aumenta. La altura del segundo pico aumenta entre pH 1.0 y 5.0 y decrece entre pH 5.0 y 9.0. A partir

de estos resultados, el valor escogido de pH para posteriores estudios fue de 2.6 por considerarlo el más apropiado según los criterios ya comentados en el capítulo 2.

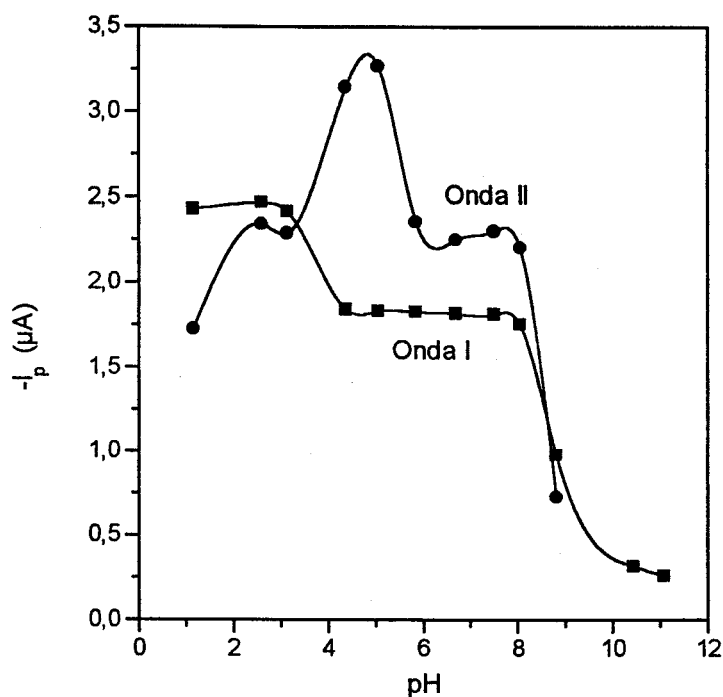


Figura 3.1.2.
Variación de la intensidad de pico con el pH para las ondas de reducción de la dibucaína.

Con el fin de conocer si es necesaria una cantidad adicional de un electrolito soporte, como puede ser el cloruro potásico, se prepararon muestras de iguales características a las preparadas en este apartado y se añadieron en cada una de ellas cantidades crecientes de cloruro potásico, cuya concentración en disolución oscilaba entre 0.004 M y 0.02 M. Este estudio mostró la innecesaria utilidad del cloruro potásico, ya que, las intensidades de pico no variaban con respecto a las obtenidas en muestras sin electrolito soporte, debido a que la cantidad de tampón fosfato es suficiente.

3.2. INFLUENCIA DEL TIEMPO DE GOTEO.

Dado que para una altura de depósito prefijada

$$A = K \cdot t_g^{3/2} \quad \text{para PPD}$$

y

$$A = K \cdot t_g^{1/2} \quad \text{para tast}$$

donde A es el área de la gota y K engloba al valor numérico 0.85 y a la velocidad de flujo de la altura prefijada. Si se mantiene constante la altura del depósito de mercurio y se registran los polarogramas correspondientes a distintos tiempos de goteo, se obtienen intensidades de pico e intensidades límites que son función de dichos tiempos de goteo.

Se obtendrán, por tanto, las expresiones:

$$I_p = f(t_g^{2/3}) \quad \text{e} \quad I_l = f(t_g^{1/2})$$

donde I_p e I_l aumentarán conforme lo haga el tiempo de goteo y variarán de forma lineal con $t_g^{2/3}$ y $t_g^{1/2}$, respectivamente.

El estudio de la influencia de este parámetro se realizó preparando una muestra en un matraz de 25 ml que contenían 10 ml de dibucaína $10^{-3}M$ en tampón fosfato 0.2 M de pH 2.6 y agua Milli-Q hasta completar el volumen. La muestra fue trasvasada a la celda polarográfica y se registraron los polarogramas para unos tiempos de goteos comprendidos entre 0.2 y 2.0 s. por tast y entre 0.2 y 2.4 s por PPD, fijando la altura del depósito de mercurio a 48.5 cm y una amplitud de pulso de -20 mV.

En las tablas 3.2.1 y 3.2.2 se muestran los valores obtenidos y en ellos se comprueba que tanto las intensidades límite como de pico aumentan al aumentar el tiempo de goteo.

Tabla 3.2.1.
Variación de los valores de intensidades límites con el tiempo de goteo en polarografía tast. Dibucaina 4×10^{-4} M.

t_g (s)	I_l (μ A) (Onda I)	I_l (μ A) (Onda II)
0.2	-0.520	-1.001
0.4	-0.589	-1.293
0.6	-0.625	-1.430
0.8	-0.670	-1.553
1.0	-0.721	-1.631
1.2	-0.749	-1.743
1.4	-0.795	-1.852
1.6	-0.821	-1.885
1.8	-0.843	-1.942
2.0	-0.875	-2.052

Tabla 3.2.2.
Variación de los valores de las intensidades de pico con el tiempo en polarografía diferencial de pulso. Dibucaina 4×10^{-4} M.

t_g (s)	I_p (μ A) (Onda I)	I_p (μ A) (Onda II)
0.2	-0.480	-0.584
0.3	-0.548	-0.633
0.4	-0.618	-0.685
0.5	-0.688	-0.740
0.6	-0.750	-0.780
0.7	-0.808	-0.828
0.8	-0.856	-0.864
1.0	-0.979	-0.916
1.2	-1.063	-0.967
1.4	-1.162	-1.027
1.6	-1.255	-1.046
1.8	-1.315	-1.114
2.0	-1.384	-1.135
2.2	-1.456	-1.168
2.4	-1.515	-1.219

En las figuras 3.2.1 y 3.2.2 se representan, respectivamente, las intensidades límite y de pico frente a $t_g^{1/2}$ y $t_g^{2/3}$ para las dos ondas de reducción. En ambas figuras se observa una dependencia lineal entre las magnitudes representadas, para ambas ondas, siendo, sin embargo, esa dependencia más acusada por PPD que por tast. Para la primera onda las ecuaciones que rigen esta dependencia son, respectivamente:

$$-I_l = 0.348 + 0.372t_g^{1/2} \quad r=0.998.$$

$$-I_p = 0.226 + 0.734t_g^{2/3} \quad r=0.999.$$

y para la segunda onda:

$$-I_l = 0.609 + 1.030t_g^{1/2} \quad r= 0.994.$$

$$-I_p = 0.463 + 0.432t_g^{2/3} \quad r= 0.994.$$

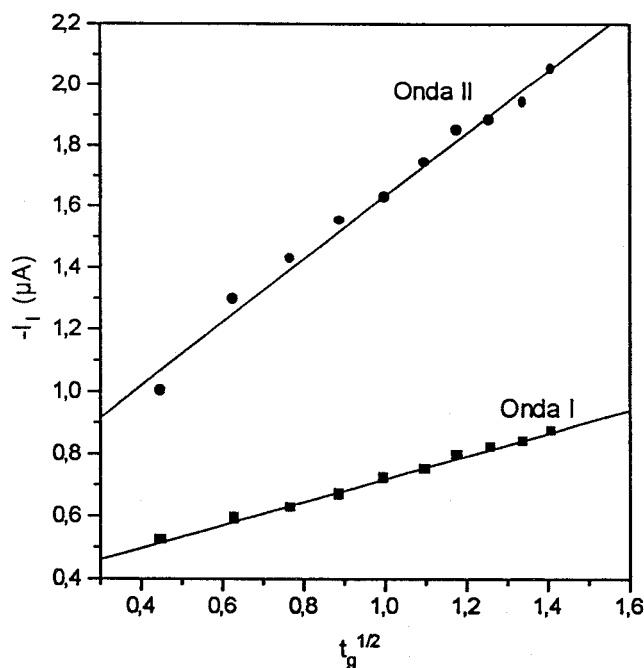


Figura 3.2.1.
Variación de la intensidad límite con respecto a la raíz cuadrada del tiempo de goteo para las dos ondas de reducción de la dibucaína.

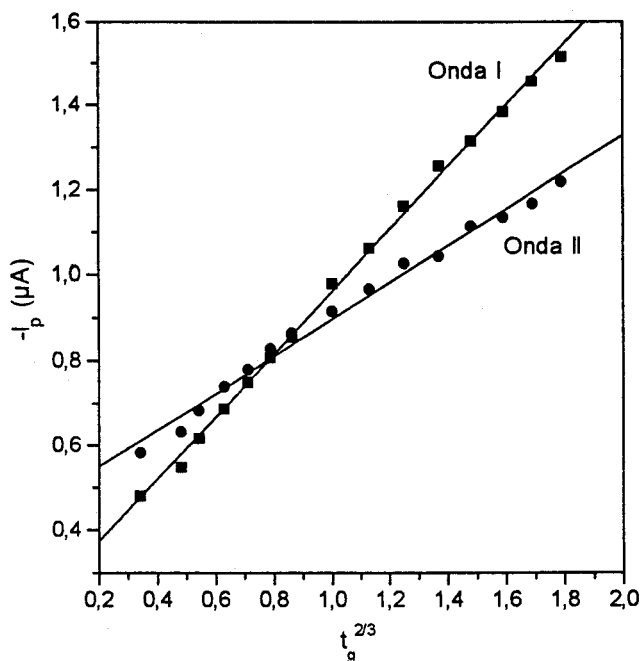


Figura 3.2.2.

Variación de la intensidad de pico con respecto a $t_g^{2/3}$ para las dos ondas de reducción de la dibucaína.

Esta dependencia lineal entre la intensidad límite y de pico, y el tiempo de goteo ($t_g^{1/2}$ y $t_g^{2/3}$) confirma que el proceso responsable de la reducción de la dibucaína es principalmente un proceso difusivo, aunque, sin olvidar que esta misma dependencia también puede corresponder a ondas catalíticas. Tras este estudio se fija un tiempo de goteo de 1 s para posteriores experiencias.

3.3. INFLUENCIA DE LA ALTURA DEL DEPÓSITO DE MERCURIO SOBRE LA INTENSIDAD DE LA ONDA POLAROGRÁFICA.

La dependencia de la altura del depósito de mercurio sobre la intensidad de corriente muestra el tipo de corriente que gobierna el proceso de reducción de la

especie electroactiva presente en el seno de la solución, de aquí el interés de este estudio.

Para tal fin, se prepararon muestras que contenían dibucaína en una concentración de $4 \cdot 10^{-4}$ M a un pH de 2.6 ajustado con tampón fosfato 0.2 M y agua Milli-Q hasta 25 ml. Se registraron los correspondientes polarogramas tanto por polarografía tast como PPD variando la altura del depósito de mercurio después de cada medida. La amplitud de pulso utilizada para PPD fue de -20 mV y la velocidad de barrido es de 5 mV/s. Los valores obtenidos se muestran en las tablas 3.3.1 y 3.3.2.

Tabla 3.3.1.
Influencia de la altura del depósito de mercurio sobre la I_p en polarografía tast.
Dibucaína 4×10^{-4} M; t_p 1s; ΔE -20 mV; V_b 5 mV/s.

h_{corr}	I_l (μA) (Onda I)	I_l (μA) (Onda II)
64.5	-1.005	-2.164
59.5	-0.962	-2.046
54.5	-0.890	-1.881
49.5	-0.845	-1.734
44.5	-0.769	-1.606
39.5	-0.730	-1.529
34.5	-0.659	-1.324

Tabla 3.3.2.
Influencia de la altura del depósito de mercurio sobre la I_p en polarografía diferencial de pulsos. Dibucaína 4×10^{-4} M; t_p 1s; ΔE -20 mV; V_b 5 mV/s.

h_{corr}	I_p (μA) (Onda I)	I_p (μA) (Onda II)
64.5	-1.406	-1.323
59.5	-1.373	-1.319
54.5	-1.304	-1.214
49.5	-1.225	-1.142
44.5	-1.112	-1.072
39.5	-1.019	-0.983
34.5	-0.924	-0.890

En las figuras 3.3.1 y 3.3.2 se han representado la variación de $h^{2/3}_{corr}$ con respecto a la intensidad límite y a la intensidad de pico, respectivamente, encontrándose en ambas representaciones una relación lineal. Por tast se han obtenido unas pendientes de 0.064 y 0.140 para las ondas I y II, respectivamente, con unos coeficientes de correlación de 0.997 y 0.992 . Por PPD, las pendientes han

vido de 0.092 y 0.082 para las ondas I y II, respectivamente, y los coeficientes de correlación de 0.994 para el primer pico y 0.993 para el segundo pico.

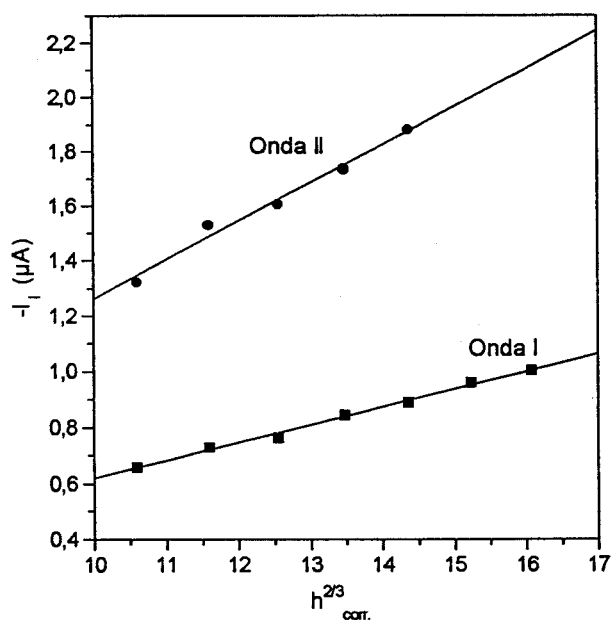


Figura 3.3.1.

Variación de la intensidad límite con respecto a $h_{corr}^{2/3}$ para las dos ondas de reducción de la dibucaína.

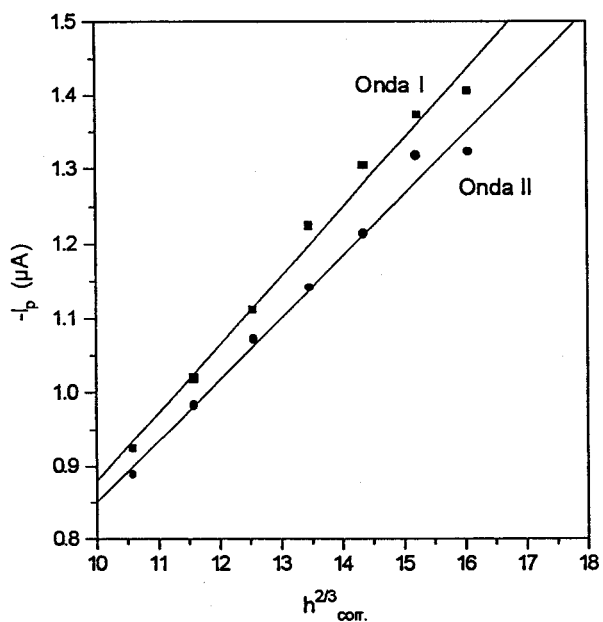


Figura 3.3.2.

Variación de la intensidad de pico en función de $h_{corr}^{2/3}$ para las dos ondas de reducción de la dibucaína.

En las figuras 3.3.3 y 3.3.4 se han representado el logaritmo de la altura del depósito de mercurio frente al logaritmo de la intensidad límite y de pico, respectivamente. Se observa en ambas representaciones una relación lineal entre ambos logaritmos. Las pendientes encontradas por tast para las dos ondas son respectivamente, 0.685 y 0.774, cuyos coeficientes de correlación son respectivamente, 0.996 y 0.996. Por PPD las pendientes de los dos picos son respectivamente, 0.709 y 0.669, siendo los coeficientes de correlación respectivamente, 0.993 y 0.993. Como se deduce de los resultados obtenidos para las pendientes, tanto para la primera onda como para la segunda, los valores de las pendientes son algo superiores a 0.67 que sería lo esperado para un proceso controlado por difusión; esto podría ser debido a la posible existencia de fenómenos de adsorción.

En experiencias posteriores se fijó una altura del depósito de mercurio de 48.5 cm.

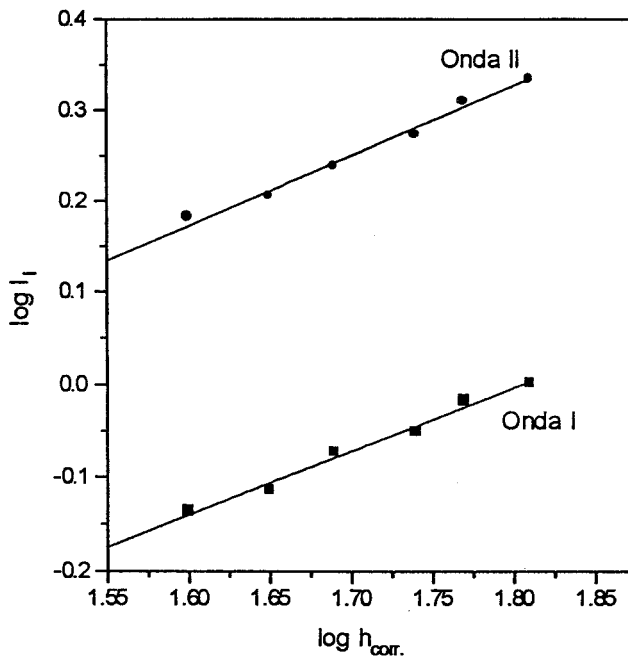


Figura 3.3.3.
Variación del logaritmo de la intensidad límite con el logaritmo de la altura del depósito de mercurio.

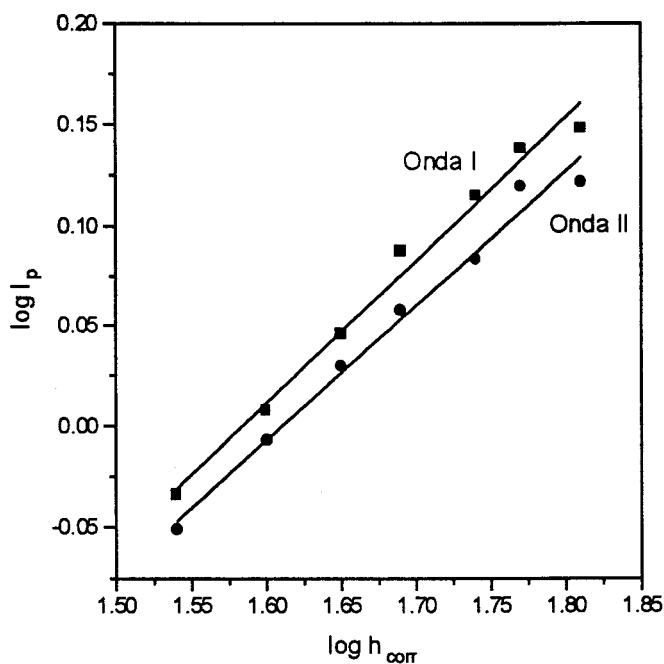


Figura 3.3.4.
Variación del logaritmo de la intensidad de pico con el logaritmo de la altura del depósito de mercurio.

3.4. INFLUENCIA DE LA AMPLITUD DE PULSO APLICADO.

Se hace necesaria la elección de un valor determinado en la magnitud de pulso aplicado, elección que debe ser un compromiso entre dos factores como son la sensibilidad y la resolución. Se sabe que cuanto mayor sea el valor de la amplitud de pulso aplicado mayor es la sensibilidad pero menor es la resolución y a la inversa. Por lo que, se hace imprescindible tomar un valor de amplitud de pulso con el que se alcance una buena sensibilidad sin perder en resolución.

Se llevó a cabo este estudio preparando muestras en matraces de 25 ml que contenían 10 ml de disolución de dibucaína 10^{-3} M en tampón fosfato 0.2 M de pH 2.6 y agua Milli-Q hasta enrase. Se registraron los polarogramas correspondientes, fijando el tiempo de goteo a 1 s y la altura del depósito de mercurio a 48.5 cm, variando en cada caso la amplitud de pulso entre -15 mV y -180 mV.

En la tabla 3.4.1 aparecen los valores de las intensidades y potenciales de pico y los correspondientes valores de amplitud de pulso. A medida que aumenta la amplitud de pulso aplicado el valor de potencial se va desplazando hacia valores más positivos, hecho que ocurre de forma más marcada en el caso de la primera onda. Se observa, además, que las intensidades de pico de las dos ondas van aumentando a medida que crece el valor de la amplitud de pulso aplicada, alcanzándose un valor donde el incremento en las intensidades es menor. Este crecimiento es aún mayor en la segunda onda que llega a duplicar prácticamente el valor de su intensidad con respecto a la primera onda para un mismo valor de amplitud, obteniéndose, de esta forma, valores de intensidades de pico muy superiores a las que se deberían de encontrar, tal y como se ha mencionado anteriormente, para un proceso de carácter difusivo, poniendo en evidencia la posible existencia de un proceso catalítico para la segunda onda.

Tabla 3.4.1.
Variación de las intensidades y potenciales de pico con la variación de la amplitud de pulso aplicado. Dibucaina 4×10^{-4} M; t_p 1 s; h 48.5 cm; V_b 5 mV/s.

ΔE (mV)	I_p (μ A) (Onda I)	E_p (mV) (Onda I)	I_p (μ A) (Onda II)	E_p (μ A) (Onda II)
-15	-0.691	-0.825	-0.676	-1.140
-20	-0.955	-0.820	-0.922	-1.140
-25	-1.262	-0.820	-1.187	-1.140
-30	-1.510	-0.815	-1.446	-1.135
-35	-1.812	-0.815	-1.726	-1.135
-40	-2.046	-0.810	-2.002	-1.135
-50	-2.471	-0.805	-2.606	-1.130
-60	-2.663	-0.795	-3.153	-1.125
-70	-2.775	-0.785	-3.700	-1.115
-80	-2.846	-0.775	-4.182	-1.110
-90	-2.873	-0.765	-4.588	-1.110
-100	-2.891	-0.755	-4.936	-1.095
-120	-2.864	-0.740	-5.431	-1.075
-140	-2.919	-0.720	-5.657	-1.055
-160	-2.919	-0.700	-5.793	-1.035
-180	-2.948	-0.680	-5.908	-1.015

En la figura 3.4.1 se han representado los valores de las intensidades de pico de ambas ondas frente a los valores aplicados de amplitud de pulso. En esta representación se observa la existencia de una dependencia lineal para unos determinados valores de amplitud de pulso. Esta dependencia lineal alcanza un rango

mayor para la segunda onda que para la primera, siendo entre -15 y -50 mV para el primer pico y entre -15 y -100 mV para el segundo pico. A partir de estos valores las intensidades de pico se hacen prácticamente constantes.

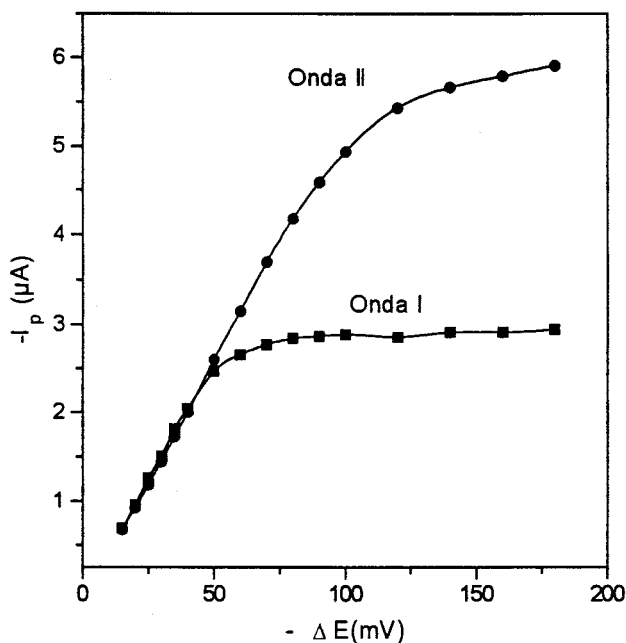


Figura 3.4.1.

Variación de la intensidad de pico de las dos ondas de reducción de la dibucaína en función de la amplitud de pulso aplicado.

Entre los rangos lineales mencionados anteriormente, se debe de tomar un determinado valor de amplitud de pulso. Se eligió -50 mV, por ser un valor límite en el rango lineal del primer pico y un valor medio en el rango lineal del segundo pico, no demasiado pequeño como para perder sensibilidad.

Es también de especial mención la existencia de un máximo en el primer pico cuando se registraron los polarogramas entre valores de amplitud de pulso de -80 y -180 mV, común en procesos de adsorción acompañados de transferencia de electrones. Este efecto puede ocurrir en polarografía diferencial de pulso cuando se satura el electrodo antes de la aplicación del pulso.

3.5. INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA.

La influencia de la temperatura sobre la corriente límite y la intensidad de pico se estudió a varias temperaturas en el intervalo comprendido entre (25 ± 1) °C y (60 ± 1) °C. A través de la variación que experimenta la onda de reducción a medida que varía la temperatura se puede deducir qué tipo de corriente controla el proceso de reducción.

Para realizar este estudio, se prepararon muestras, en matraces de 25 ml donde se añadieron 10 ml de dibucaína 10^{-3} M en tampón fosfato 0.2 M de pH 2.6 y por último completando el volumen con agua Milli-Q. Las muestras se llevaron a la celda polarográfica donde se paso nitrógeno durante 10 minutos y a continuación se registraron sus polarogramas correspondientes mediante las técnicas tast y PPD, variando en cada medida la temperatura a la cual fue sometida la muestra.

En las tablas 3.5.1 y 3.5.2 se recogen los valores de las temperaturas y los logaritmos de las intensidades límite y de pico, respectivamente de las dos ondas de reducción de la dibucaína y en las figuras 3.5.1 y 3.5.2 se representan estos valores.

Tabla 3.5.1.
Variación del logaritmo de la intensidad límite con la temperatura.

T (°C)	log I_l (Onda I)	log I_l (Onda II)
25	-0.088	0.250
30	-0.061	0.270
35	-0.037	0.300
40	-0.006	0.370
46	0.036	0.430
50	0.059	0.480
55	0.089	0.540
60	0.120	0.660

Tabla 3.5.2.
Variación del logaritmo de la intensidad de pico con respecto a la temperatura.

T (°C)	log I _p (Onda I)	log I _p (Onda II)
25	0.022	0.010
30	0.041	0.039
35	0.052	0.068
40	0.083	0.150
46	0.120	0.170
55	0.140	0.200
60	0.150	0.230

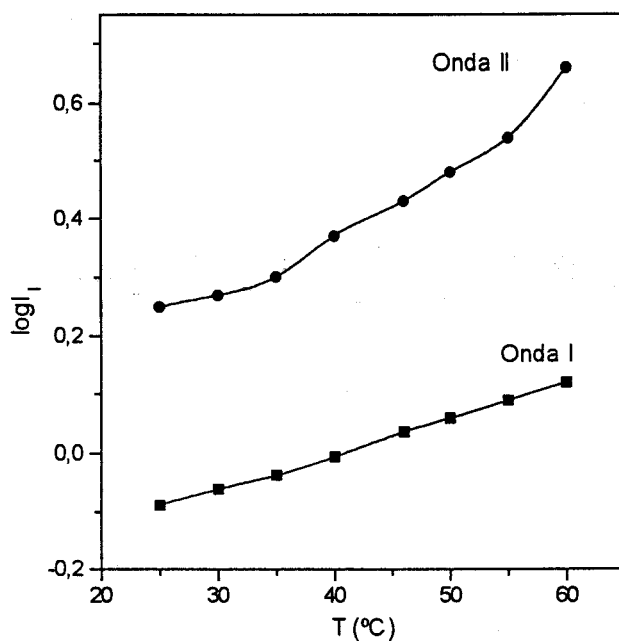


Figura 3.5.1.
Variación del logaritmo de la intensidad límite con la temperatura.

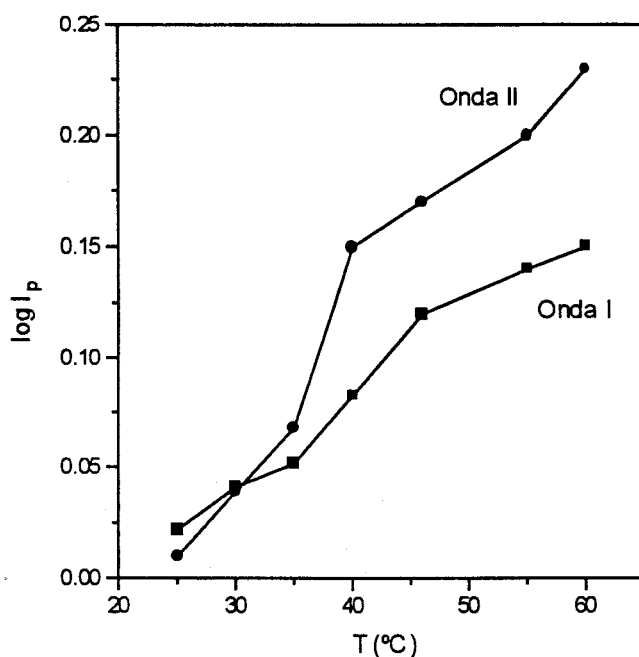


Figura 3.5.2.
Variación del logaritmo de la intensidad de pico con la temperatura.

Aplicando la siguiente ecuación se calculan los coeficientes de temperatura para ambas ondas, tanto por tast como por PPD:

$$T_{\text{coeff}}\% = \left[\frac{2.303}{T_2 - T_1} \cdot \log \frac{i_2}{i_1} \right] \cdot 100$$

Los coeficientes de temperatura para la primera onda por tast y PPD son, respectivamente, $1.33 \text{ } ^\circ\text{C}^{-1} \%$ y $0.82 \text{ } ^\circ\text{C}^{-1} \%$, valores que concuerdan con un proceso controlado por difusión.

Los coeficientes de temperatura para la segunda onda tanto por tast como por PPD son, respectivamente, $2.31 \text{ } ^\circ\text{C}^{-1} \%$ y $1.44 \text{ } ^\circ\text{C}^{-1} \%$, valores más altos que para la primera onda y que en el caso de la técnica tast no corresponde a un proceso controlado por difusión. Se puede afirmar que la segunda onda es más dependiente que la primera onda de los cambios que puede experimentar la temperatura, y esto justifica que no se la considere de mucho interés con fines analíticos.

3.6 ESTUDIO DE LA REVERSIBILIDAD.

En este apartado se ha estudiado mediante polarografía tast, polarografía diferencial de pulso y voltamperometría cíclica la reversibilidad del proceso de reducción de la dibucaína.

3.6.1 ESTUDIO DE LA REVERSIBILIDAD MEDIANTE TAST.

Los criterios empleados fueron: análisis logarítmico de la función intensidad-potencial y determinación del valor de $E_{3/4}-E_{1/4}$.

Para este fin se registran polarogramas de disoluciones de dibucaína 4×10^{-4} M a pH 2.6 y sobre los resultados se aplicaron los criterios de reversibilidad, tales como el análisis logarítmico de las curvas (I, E) y el cálculo de $E_{3/4} - E_{1/4}$.

Para cada de las ondas se representó $-E(V)$ frente al $\log I/I_1-I$, calculándose las pendientes en cada caso. El valor de las pendientes obtenidas es igual a $0.0542/\alpha n_a$, con lo que, se puede calcular para cada onda el valor de α simplemente con saber el número de electrones intercambiados.

En las tablas 3.6.1.1 y 3.6.1.2 se muestran los valores obtenidos y en las figuras 3.6.1.1 y 3.6.1.2 las representaciones correspondientes.

Tabla 3.6.1.1.
Análisis logarítmico de la función intensidad-potencial para la primera onda de reducción de la dibucaína a pH 2.6; C 4×10^{-4} M; t_p 1 s.

E(V)	I(μ A)($I_1=-0.721\mu$ A)	Log I/ I_1-I
-0.77	-0.010	-1.852
-0.78	-0.024	-1.456
-0.79	-0.050	-1.125
-0.80	-0.081	-0.896
-0.81	-0.167	-0.521
-0.82	-0.257	-0.256
-0.83	-0.380	0.046
-0.84	-0.524	0.425
-0.85	-0.600	0.696
-0.86	-0.657	1.012

Tabla 3.6.1.2.
Análisis logarítmico de la función intensidad-potencial para la segunda onda de reducción de la dibucaína a pH 2.6; $C 4 \times 10^{-4} M$; $t_p 1 s$.

E(V)	I(μA)($I_r = -1.631 \mu A$)	Log I/ $I_r - I$
-1.06	-0.017	-1.967
-1.07	-0.040	-1.672
-1.08	-0.071	-1.341
-1.09	-0.156	-0.976
-1.10	-0.284	-0.676
-1.11	-0.508	-0.345
-1.12	-0.814	-0.002
-1.13	-1.104	0.321
-1.14	-1.297	0.589
-1.15	-1.465	0.945
-1.16	-1.543	1.245

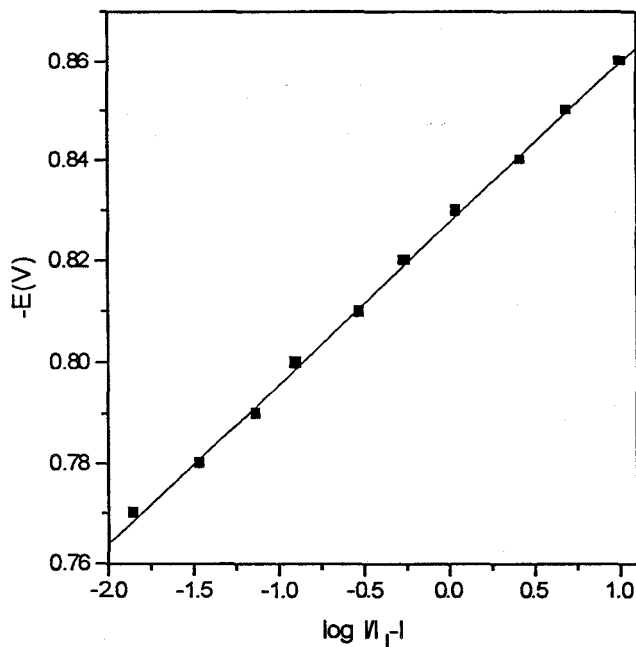


Figura 3.6.1.1.
Análisis logarítmico de la función intensidad-potencial. Estudio de la reversibilidad para la primera onda de reducción de la dibucaína.

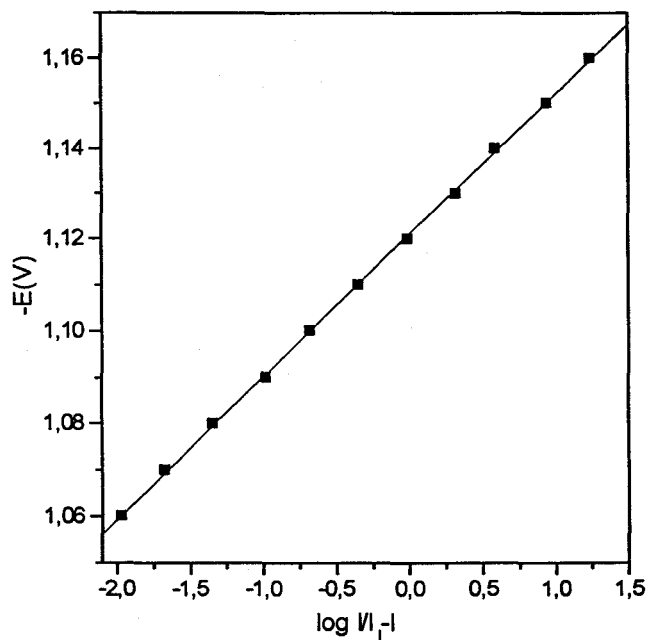


Figura 3.6.1.2.
Análisis logarítmico de la función intensidad-potencial. Estudio de la reversibilidad para la segunda onda de reducción de la dibucaína.

En ambas figuras se observa una dependencia lineal entre el potencial y el logaritmo del cociente de intensidades. Para la primera onda se obtiene la ecuación:

$$-E = 0.828 + 0.032 \log I / (I_1 - I)$$

con un coeficiente de correlación de 0.9993. La ordenada en el origen, -0.828, coincide con el potencial de semionda (-0.83 V), y a través de la pendiente, 0.032, se obtiene un valor de αn_a de 1.5. En el caso que n_a sea igual a 2 se obtiene un valor de α de 0.75, lo que muestra claramente que el proceso que tiene lugar es un proceso irreversible.

Para la segunda onda se obtiene la ecuación:

$$-E = 1.121 + 0.031 \log I / (I_1 - I)$$

con un coeficiente de correlación de 0.9998. La ordenada en el origen, -1.121, coincide prácticamente con el valor del potencial de semionda (-1.130 V), y a partir de la pendiente, 0.031, se obtiene un valor de αn_a de 1.7. Estos datos muestran que el proceso es también irreversible.

Para la determinación del valor de $E_{3/4} - E_{1/4}$ sólo se ha estudiado la primera onda de reducción debido a que la segunda onda puede ser una onda catalítica, sin interés analítico. Se ha escogido el polarograma cuyos datos vienen recogidos en la tabla 3.6.1.1. Para esta primera onda se obtienen valores de $E_{3/4}$ y $E_{1/4}$ de -0.85 V y -0.82 V, respectivamente. La diferencia entre ambas magnitudes da un valor de 0.03, valor que coincide con el obtenido de $0.059/n$, considerando n igual a 2. Por tanto, se puede concluir que el proceso es irreversible.

3.6.2. ESTUDIO DE LA REVERSIBILIDAD MEDIANTE PPD.

Los criterios empleados fueron:

A) Criterio de Birke (6).

En la figura 3.6.2.1 se encuentran los polarogramas correspondientes al barrido anódico y catódico (utilizando amplitud de pulso +50 mV para el barrido anódico y -50 mV para el barrido catódico) para una muestra de concentración 10^{-4} M en dibucaína y de pH 2.6.

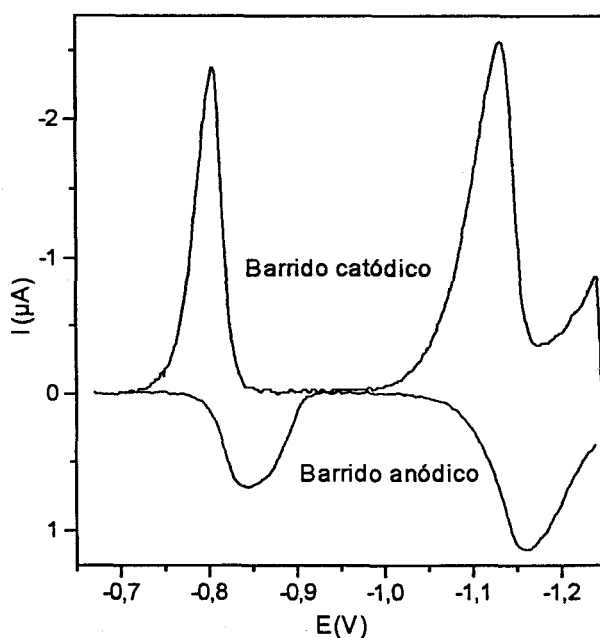


Figura 3.6.2.1.
Estudio de la reversibilidad. Criterio de Birke aplicado a las ondas de reducción de la dibucaína.

En las tablas 3.6.2.1 y 3.6.2.2 se recogen los valores de potencial de pico anódico y catódico, así como, las intensidades de pico anódicas y catódicas para las dos ondas de reducción.

Tabla 3.6.2.1.
Estudio de la reversibilidad. Criterio de Birke para la primera onda de reducción.

Barrido anódico		Barrido catódico	
I_p^a (μA)	E_p^a (V)	I_p^c (μA)	E_p^c (V)
0.676	-0.845	-2.401	-0.800

Tabla 3.6.2.2.
Estudio de la reversibilidad. Criterio de Birke para la segunda onda de la dibucaína.

Barrido anódico		Barrido catódico	
I_p^a (μA)	E_p^a (V)	I_p^c (μA)	E_p^c (V)
1.103	-1.160	-2.571	-1.125

El cociente entre la altura del pico anódico y el pico catódico es aproximadamente de 0.28, valor menor que 1 y la diferencia entre el potencial del

pico catódico menos el potencial del pico anódico es de 45 mV, aproximadamente igual que la amplitud de pulso. Según estos datos la primera onda parece responder a una transferencia de carga irreversible.

Para la segunda onda se obtiene un cociente entre intensidades anódica y catódica de -0.429, valor menor de 1 que indica que el proceso es irreversible. Además, la diferencia entre potenciales de pico anódico y catódico es muy similar al valor de la amplitud de pulso aplicada.

B) Determinación de la anchura de medio pico $W_{1/2}$ cuando $\Delta E=0$ (7).

Para la aplicación de este criterio y del siguiente se han empleado los polarogramas obtenidos en el estudio de la influencia de la amplitud de pulso (apartado 3.4). En la tabla 3.6.2.3 se recogen los datos necesarios para llevar a cabo este estudio y de ellos se obtiene la figura 3.6.2.2.

Tabla 3.6.2.3.
Estudio de la reversibilidad. Determinación de $W_{1/2}$.

$\Delta E(\text{mV})$	$W_{1/2}(\text{mV})$
-10	45
-20	40
-30	37
-40	35
-50	36
-60	36
-70	37
-80	39
-90	39
-100	37

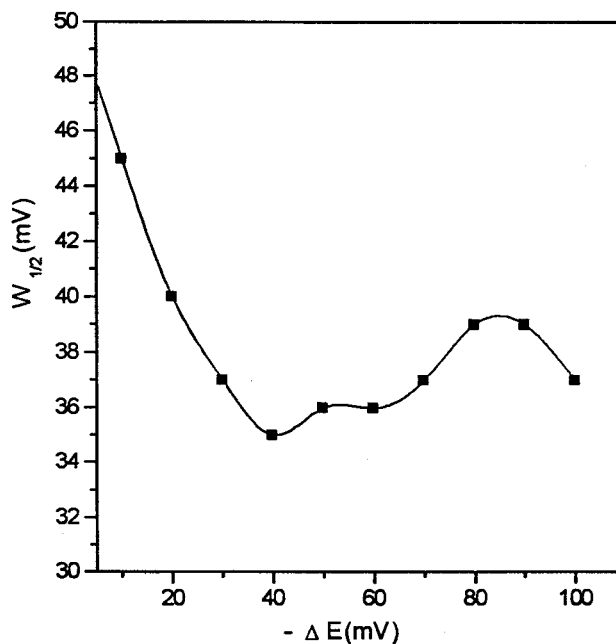


Figura 3.6.2.2.
Estudio de la reversibilidad. Determinación de $W_{1/2}$.

Según se observa en la figura, cuando ΔE es igual a cero la $W_{1/2}$ alcanza un valor aproximado de 47.5 mV, que indica que la onda es claramente irreversible si el número de electrones involucrados es igual a 2.

C) Variación de E_p con ΔE (8).

En la tabla 3.6.2.4 se recogen los valores obtenidos de potencial de pico para distintos valores de amplitud de pulso para las dos ondas. De ellos se deduce que a medida que aumenta la amplitud de pulso el potencial de pico se desplaza hacia valores menos catódicos. Si se representa el potencial de pico frente a la amplitud de pulso se observa una dependencia lineal para las dos ondas entre ambas magnitudes como se recoge en la figura 3.6.2.3.

Tabla 3.6.2.4.
Estudio de la reversibilidad. Variación de E_p con ΔE para las dos ondas de reducción.

ΔE (mV)	E_p (mV) (Onda I)	E_p (mV) (Onda II)
-10	-815	-1125
-20	-805	-1115
-30	-795	-1110
-40	-775	-1090
-50	-765	-1080
-60	-750	-1065
-70	-735	-1055
-80	-720	-1045
-90	-705	-1035
-100	-695	-1020

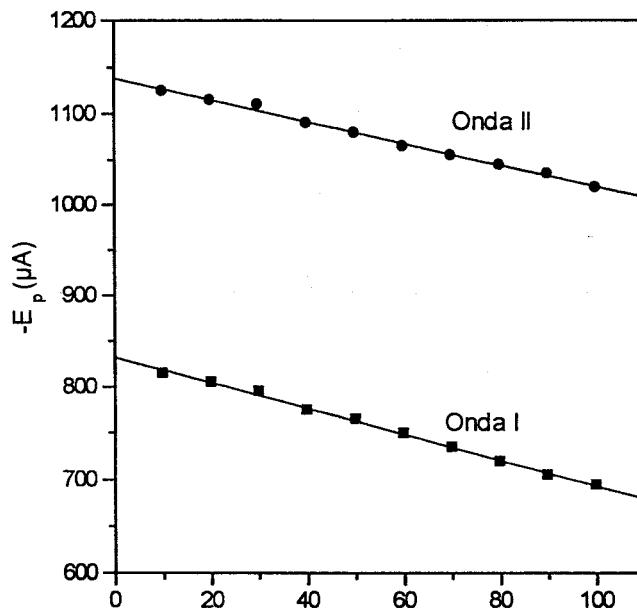


Figura 3.6.2.3.
Variación del potencial de pico en función de la amplitud de pulso.

Las ecuaciones que rigen la dependencia lineal entre el potencial de pico y la amplitud de pulso vienen dadas por:

$$-E_p = 832.2 + 1.388\Delta E$$

para la primera onda que presenta una ordenada en el origen de -832.2 que coincide con el potencial de onda media para esa onda, -830.0 mV. La pendiente obtenida, -1.388 , difiere en gran medida de la que se debería haber obtenido en el caso de que el proceso fuera reversible (-0.5).

$$-E_p = 1139 + 1.182 \Delta E$$

para la segunda onda que presenta una ordenada en el origen, -1139 , que coincide con el potencial de semionda para esa onda, -1130 mV. La pendiente difiere, también en este caso, ampliamente de la obtenida para procesos reversibles.

Se concluye que, según este criterio, ambas ondas responden a procesos irreversibles.

D) Relación entre I_p y $\sigma^{-1}/\sigma+1$ (8).

La reversibilidad o irreversibilidad de un proceso se puede confirmar estudiando la relación existente entre la intensidad de pico y $\sigma^{-1}/\sigma+1$. Si en la representación entre la intensidad de pico y $\sigma^{-1}/\sigma+1$ se obtiene una línea recta, el proceso que tiene lugar en el electrodo de gotas de mercurio es un proceso reversible, mientras que si no se obtiene dependencia lineal, entonces, se trataría de un proceso irreversible.

A partir de los datos de ΔE mostrados en el apartado 3.4 del presente capítulo se deducen los valores de $\sigma^{-1}/\sigma+1$ para cada valor de intensidad de pico. La deducción de estos valores, conociendo n y ΔE se realiza a través de la siguiente expresión:

$$\sigma = e^{\frac{nF \Delta E}{RT \cdot 2}}$$

Considerando a n como 2 (siendo n el número de electrones intercambiados en el proceso de reducción de la especie electroactiva) se obtienen los valores de $\sigma^{-1}/\sigma+1$ que aparecen en la tabla 3.6.2.5 junto con los correspondientes valores de I_p y ΔE .

Tabla 3.6.2.5.
Estudio de la reversibilidad. Relación entre I_p y $\sigma-1/\sigma+1$.

$-\Delta E(\text{mV})$	$\sigma-1/\sigma+1$	$I_p (\mu\text{A})$ (Onda I)	$I_p (\mu\text{A})$ (Onda II)
15	-0.285	-0.691	-0.676
20	-0.372	-0.955	-0.922
25	-0.452	-1.262	-1.187
30	-0.527	-1.510	-1.446
35	-0.594	-1.812	-1.726
40	-0.653	-2.046	-2.002
50	-0.751	-2.471	-2.606
60	-0.825	-2.663	-3.153
70	-0.878	-2.775	-3.700
80	-0.916	-2.846	-4.182
90	-0.942	-2.873	-4.588
100	-0.961	-2.891	-4.936
120	-0.982	-2.864	-5.431
140	-0.992	-2.919	-5.657
160	-0.996	-2.919	-5.793
180	-0.998	-2.948	-5.908

En la figura 3.6.2.4 se ha representado la intensidad de pico en función de $\sigma-1/\sigma+1$ donde se observa un crecimiento en los valores de $\sigma-1/\sigma+1$ a medida que aumentan las intensidades de pico en las dos ondas de reducción. Este aumento, sin embargo, no es lineal lo que, en consecuencia, pone de manifiesto que el proceso responsable de la reducción es irreversible.

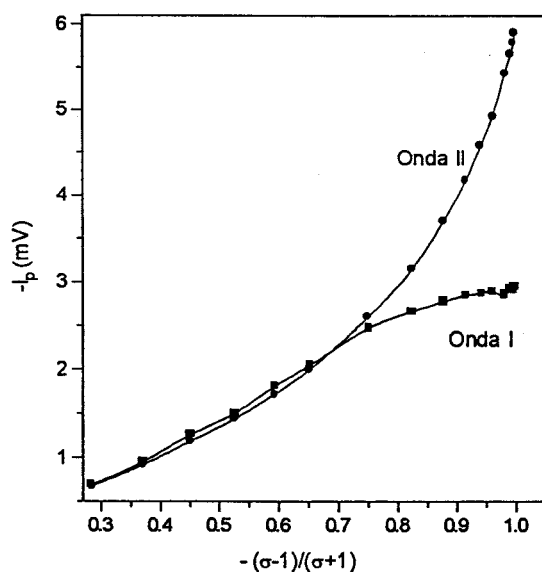


Figura 3.6.2.4.
Estudio de la reversibilidad. Relación entre I_p y $\sigma-1/\sigma+1$ (para $n=2$).

3.6.3. ESTUDIO DE LA REVERSIBILIDAD MEDIANTE VOLTAMPEROMETRÍA CÍCLICA.

Para aportar mayor información sobre los procesos de reducción de la dibucaína se estudió la influencia de la velocidad de barrido en voltamperometría cíclica. Para ello se tomó una muestra preparada en un matraz de 25 ml que contenía 10 ml de dibucaína 10^{-3} M en tampón fosfato 0.2 M de pH 2.6 y agua Milli-Q hasta completar el volumen de 25 ml y se observó la evolución del potencial y la intensidad de pico en los voltamperogramas obtenidos utilizando velocidades de barrido entre 10 y 800 mV/s.

En la tabla 3.6.3.1 y 3.6.3.2 se recogen los datos obtenidos para las dos ondas de reducción, donde se observa que a medida que aumenta la velocidad de barrido el potencial de pico se desplaza hacia valores más catódicos y la intensidad de pico aumenta.

Tabla 3.6.3.1.
Influencia de la velocidad de barrido en la intensidad de pico y el potencial de pico en los ciclovoltamperogramas obtenidos para la primera onda.

Vb(mV/s)	Vb ^{1/2}	E _p (mV)	I _p (μ A)
10	3.162	-910	-1.096
15	3.872	-914	-1.506
20	4.472	-916	-1.562
30	5.477	-918	-2.08
40	6.325	-920	-2.379
60	7.746	-924	-3.117
80	8.944	-928	-3.713
100	10.000	-930	-4.518
150	12.247	-934	-5.552
200	14.142	-936	-6.352
300	17.321	-938	-7.541
400	20.000	-946	-9.897
600	24.495	-948	-13.362
800	28.284	-952	-15.188

Tabla 3.6.3.2.
Influencia de la velocidad de barrido en la intensidad y el potencial de pico en los ciclovoltamperogramas obtenidos para la segunda onda.

$V_b(\text{mV})$	$V_b^{1/2}$	$E_p(\text{mV})$	$I_p(\mu\text{A})$
10	3.162	-992.0	-0.493
15	3.872	-1.258	-2.081
20	4.472	-1.260	-2.239
30	5.477	-1.256	-2.890
40	6.325	-1.256	-3.335
60	7.746	-1.256	-4.390
80	8.944	-1.258	-5.172
100	10.000	-1.260	-6.037
150	12.247	-1.264	-7.769
200	14.142	-1.266	-8.789
300	17.321	-1.272	-10.425
400	20.000	-1.278	-13.465
600	24.495	-1.284	-17.873
800	28.284	-1.290	-19.894

La representación del potencial de pico de estas ondas frente a $V_b^{1/2}$ se encuentra recogida en la figura 3.6.3.1.

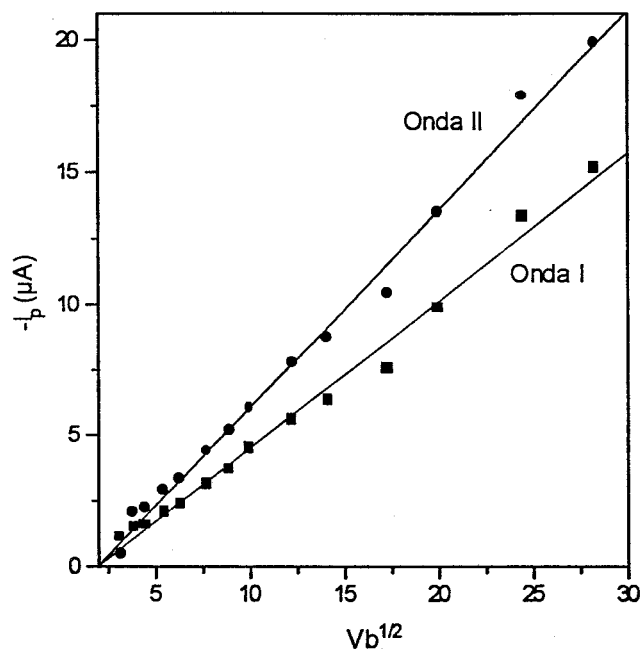


Figura 3.6.3.1.
Influencia de la velocidad de barrido en la intensidad de pico.

La variación lineal entre ambas magnitudes pone de manifiesto, de acuerdo con los fundamentos teóricos expresados en el capítulo 2 de esta memoria, que los procesos responsables de dichas ondas están controladas por la difusión de la sustancia electroactiva hacia el electrodo de trabajo, confirmándose, por tanto los resultados encontrados en PPD.

Las ecuaciones que rigen esta dependencia lineal para cada una de las ondas de reducción del compuesto objeto de estudio son las siguientes:

$$-I_p = 1.105 - 0.560Vb^{1/2}$$

para la primera onda con un coeficiente de correlación obtenido de 0.994.

$$-I_p = 1.447 - 0.752Vb^{1/2}$$

para la segunda onda con un coeficiente de correlación es de 0.997.

Igualmente se puede confirmar la irreversibilidad de los procesos redox responsables de cada una de las ondas de reducción ya que mediante la técnica de voltamperometría cíclica se obtiene únicamente señal de reducción, sin aparecer en el barrido anódico la señal de oxidación correspondiente, como se muestra en la figura 3.6.3.2.

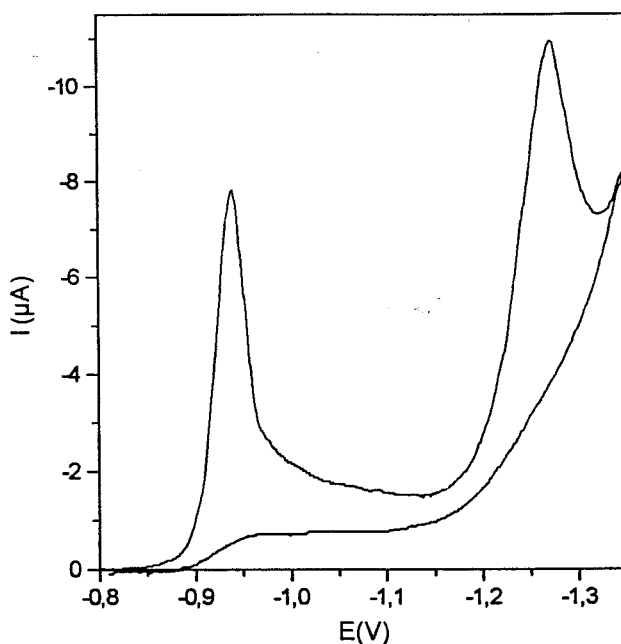


Figura 3.6.3.2.
Estudio de la reversibilidad mediante voltamperometría cíclica. Dibucaína $4 \cdot 10^{-4}$ M a pH 2.6; V_b 10 mV/s.

En la tabla 3.6.3.3 se muestran los valores de $n_a\alpha$, para la primera onda, calculados a partir de la diferencia entre E_p y los $E_{p1/2}$.

Tabla 3.6.3.3.
Estimación del factor $n_a\alpha$.

Vb(mV/s)	$n_a\alpha$	$E_p(V)$	$E_{p1/2}(V)$
10	1.92	-0.910	-0.885
15	1.78	-0.914	-0.887
20	1.78	-0.916	-0.889
30	1.66	-0.918	-0.889
40	1.66	-0.920	-0.891
60	1.55	-0.924	-0.893
80	1.50	-0.928	-0.896
100	1.60	-0.930	-0.900
150	1.66	-0.934	-0.905
200	1.85	-0.936	-0.910
300	1.85	-0.938	-0.912
400	1.60	-0.946	-0.916
600	1.55	-0.948	-0.917
800	1.45	-0.952	-0.919
$n_a\alpha_m=1.67$			

3.7 DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE ELECTRONES.

Sólo se ha calculado el número de electrones involucrados en el proceso electroquímico correspondiente a la primera onda, dada la dificultad que supone que el potencial de descarga del electrolito de fondo esté próximo al potencial necesario para alcanzar la meseta difusiva de la segunda onda. El método seguido es el coulombimétrico a potencial controlado.

Para llevar a cabo este estudio se utilizaron disoluciones de dibucaína en medio ácido y en medio neutro preparadas en matraces de 50 ml. Todas ellas poseían una concentración de dibucaína de $1.75 \cdot 10^{-4}$ M. Las disoluciones ácidas contenían tampón fosfato 0.2 M a pH 2.6, y las disoluciones en medio neutro contenían tampón fosfato 0.2 M de pH 6.5.

Las muestras así preparadas se llevan a la celda polarográfica y se electrolizan durante un cierto tiempo, agitando y manteniendo un potencial constante de -1 V, valor al cual la primera onda de reducción se ha desarrollado por completo. Durante este estudio se registra continuamente la intensidad en función del tiempo transcurrido y, una vez se interrumpe la electrólisis, se registra el polarograma de la disolución resultante con el fin de conocer la concentración de dibucaína restante después de la electrólisis.

A partir de las expresiones $Q = \int Idt$ y $n^{\circ} \text{moles} = Q/nF$ se calcula la cantidad de electricidad consumida y la masa en gramos del compuesto que se ha electrolizado.

Los datos obtenidos para las tres experiencias realizadas a pH 2.6 se recogen en la tabla 3.7.1.

Tabla 3.7.1.
Cálculo del número de electrones involucrados en el proceso de reducción de la dibucaína a pH 2.6.

Muestra	Masa ($g \times 10^{-3}$)	Q(C)	n calculado
1	3.99	1.856	1.83
2	4.00	1.894	1.86
3	3.99	1.805	1.78
Valor medio			1.82

De forma análoga, en la tabla 3.7.2 se recogen los datos obtenidos a pH 6.5.

Tabla 3.7.2.
Cálculo del número de electrones involucrados en el proceso de reducción de la dibucaína a pH 6.5.

Muestra	Masa ($g \times 10^{-3}$)	Q (C)	n calculado
1	3.99	2.109	2.08
2	3.99	1.476	1.46
3	3.98	2.020	2.00
Valor medio			1.85

De este estudio se deduce que en ambos medios el número de electrones involucrados en el proceso de reducción es el mismo, pudiendo considerar como 2 el número de electrones intercambiados.

3.8. MECANISMO DE REDUCCIÓN DE LA DIBUCAÍNA.

Para conocer el mecanismo de reducción de la dibucaína es necesario conocer el número de protones, p , que intervienen en el proceso y estos se calculan a partir de αn_a .

El valor de αn_a se puede conocer a través del análisis logarítmico de la función intensidad-potencial y también, mediante la relación existente entre los E_p y $E_{p1/2}$ obtenidos por voltamperometría cíclica. En el apartado 3.6.1 se han mostrado los valores calculados de αn_a para una muestra de dibucaína de pH 2.6, siendo este valor de 1.5 para la primera onda de reducción según el método empleado para llevar a cabo el cálculo. Siguiendo los mismos métodos se ha encontrado que para muestras de pH 6.5 el valor obtenido de αn_a para esta primera onda es de 2.7. La media entre estos valores de αn_a es de 2.1.

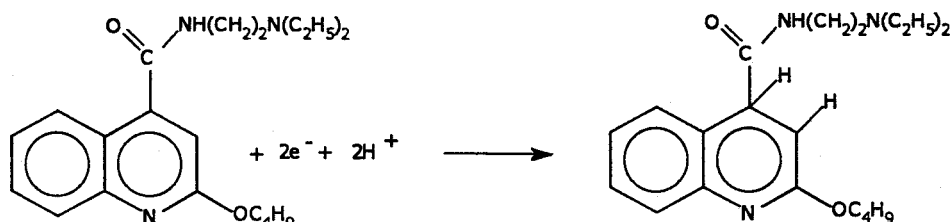
Una vez conocido el valor de αn_a se calcula el número de protones que participan en el proceso de reducción, a partir de la siguiente expresión:

$$\frac{\Delta E_{1/2}}{\Delta \text{pH}} = \frac{0.059p}{\alpha n_a}$$

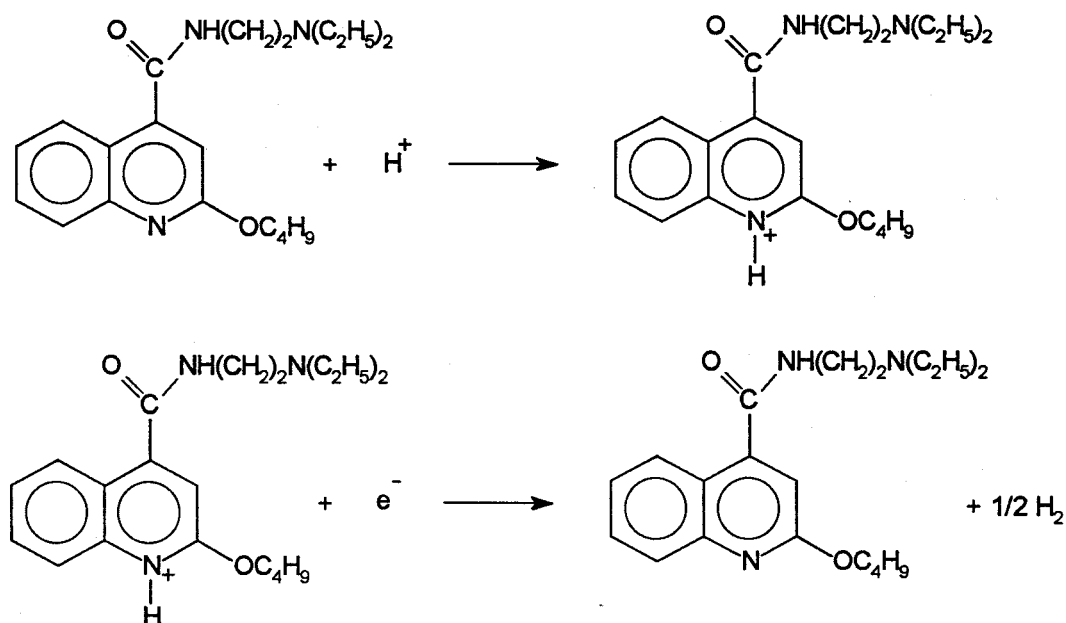
El potencial de onda media a pH 2.6 es de -0.83 V y este a pH 6.5 es de -1.07 V, por lo que, aplicando esta ecuación se obtiene un valor de p de 2.2.

Se concluye, por tanto, que en el proceso de reducción de la dibucaína intervienen dos electrones y dos protones, y por su similitud estructural con la nicotinamida (258) que presenta dos ondas polarográficas, donde la primera es proporcional a la concentración y la segunda que aparece a potenciales más negativos

que la primera es una onda catalítica, se propone el siguiente mecanismo de reducción para la especie objeto de estudio.



Por otra parte, el comportamiento polarográfico de la dibucaína muestra que la segunda onda es una onda catalítica de H^+ generada por el anillo quinolínico. El anillo quinolínico sufre una reacción de protonación para dar el ión quinolina:



El ion quinolina es entonces reducido dando lugar a la regeneración del anillo quinolínico con deshidrogenación. La reacción global es la reducción del ion hidrógeno a hidrógeno gas. Sin embargo, esta reacción ocurre a un potencial que es significativamente más bajo que el normalmente requerido para la reducción del ion hidrógeno, y forma una onda cuya altura es proporcional a la concentración de la dibucaína, indicando que la reacción catalítica ocurre en la disolución. Debido a que la

dibucaína no se consume y se regenera rápidamente, la corriente límite es mucho más alta que la correspondiente al proceso controlado por difusión. Esta onda no es adecuada para aplicaciones analíticas.

3.9. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN.

La influencia de la concentración de dibucaína se ha estudiado mediante polarografía diferencial de pulso siguiendo la variación que se produce en las intensidades de pico. La I_p viene dada por la ecuación:

$$I_p = nFAC_{\infty} \sqrt{\frac{D}{\pi t_r}} \frac{\sigma - 1}{\sigma + 1}$$

donde $\sigma = e^{\frac{nF \Delta E}{RT}}$, siendo ΔE la amplitud de pulso. El máximo valor que puede tomar $\sigma - 1 / \sigma + 1$ obtenido para altas amplitudes de pulso es la unidad, y la expresión se transforma en la de Cottrell, obteniéndose una onda y no un pico.

Si mantenemos constantes todos los parámetros excepto la concentración de especie electroactiva tendremos que, para una onda de difusión,

$$I_p = f(C)$$

Para comprobar esta expresión se prepararon muestras, en matraces de 25 ml, que contenían cantidades crecientes de dibucaína entre 9.5 y 950 μg (10^{-6} y 10^{-4} M), tampón fosfato 0.2 M de pH 2.6 y agua Milli-Q hasta completar el volumen.

Las muestras fueron llevadas a la celda polarográfica donde fueron previamente desoxigenadas mediante el paso de nitrógeno durante 10 min. antes de llevar a cabo la medida de I_p , que se realizaron en las siguientes condiciones experimentales: V_b 5 mV/s; ΔE -50 mV; t_g 1 s; T° 25 $^\circ\text{C}$; h 48.5 cm.

En la tabla 3.9.1 se recogen los valores de las intensidades de pico obtenidos para las distintas concentraciones de dibucaína ensayadas y en la figura 3.9.1 se muestra una representación gráfica de estos valores.

Tabla 3.9.1.
Variación de las intensidades de pico con la concentración de dibucaína.

C(M)	I _p (μA)(Onda I)	I _p (μA)(Onda II)
1×10 ⁻⁶	-0.039	-0.061
4×10 ⁻⁶	-0.068	-0.105
5×10 ⁻⁶	-0.085	-0.135
1×10 ⁻⁵	-0.141	-0.229
2×10 ⁻⁵	-0.226	-0.371
4×10 ⁻⁵	-0.426	-0.735
5×10 ⁻⁵	-0.543	-0.944
1×10 ⁻⁴	-1.026	-1.678

Como muestra la figura existe linealidad en el rango de concentraciones entre 10⁻⁶ y 10⁻⁴ M. A concentraciones mayores de estas no hay linealidad debido posiblemente a efectos de adsorción. Además a más altos rangos de concentraciones se observa la existencia de un nuevo pico a un potencial cercano a -1.520 V.

Para el primer pico, la ecuación que relaciona la intensidad de pico con la concentración es:

$$-\Delta I_p = +0.0327 + 9966.81C$$

siendo el coeficiente de correlación de 0.9998, observándose excelente linealidad. Para el segundo pico, la ecuación que relaciona la intensidad de pico con la concentración es:

$$-\Delta I_p = +0.05658 + 1.6545.05C$$

siendo el coeficiente de correlación de 0.9987, observándose en este caso menor linealidad que en el primer pico. Además, los valores de intensidad de pico correspondientes a esta onda parecen ser más altos de lo que corresponderían a una

onda controlada por difusión, lo que indica que puede tratarse de un proceso catalítico como se ha comentado anteriormente.

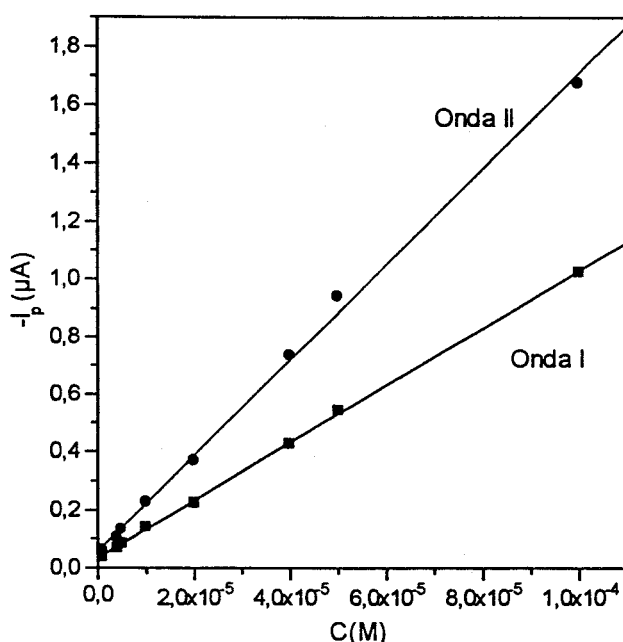


Figura 3.9.1.
Variación de la intensidad de pico con la concentración de la dibucaína.

Con este estudio, se corrobora además la naturaleza difusiva de los procesos responsables de la reducción al existir linealidad entre las magnitudes estudiadas.

3.10. PROCEDIMIENTO RECOMENDADO PARA LA DETERMINACIÓN DE DIBUCAÍNA.

Para la determinación de dibucaína en solución acuosa se preparan muestras en matraces de 25 ml, que contengan de 9.5 a 950 µg de dibucaína, tampón fosfato 0.2 M de pH 2.6 y agua Milli-Q hasta enrase. A continuación, las muestras se colocan en la celda polarográfica donde se registran los polarogramas correspondientes, después de desoxigenar durante 10 min. con una corriente de nitrógeno puro, desde -0.650 a 1.350 V frente al electrodo de calomelanos saturado. Los polarogramas se

registran utilizando una amplitud de pulso de -50 mV, un tiempo de goteo de 1 s, una altura de la columna de mercurio de 48.5 cm y una velocidad de barrido de 5 mV/s. A partir de los valores obtenidos de las intensidades de pico y por comparación con la correspondiente recta de calibrado, se determina la concentración de la dibucaína.

3.11. REPRODUCIBILIDAD Y SEGURIDAD DEL MÉTODO.

Para conocer la reproducibilidad del método propuesto se prepararon 9 muestras iguales, conteniendo 0.25 ml de dibucaína 10^{-3} M, en las condiciones experimentales descritas en el apartado anterior.

Se registran los polarogramas correspondientes, obteniéndose los valores de intensidad de pico pertenecientes a cada una de las ondas de reducción y se calculan los parámetros estadísticos (\bar{y} (I_{pr} , μA); s ; s_m y $\%E$) que se recogen en la tabla 3.11.1.

$$\bar{y} = \sum_{i=1}^n y_i \quad s = \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}{n} \quad s_m = \frac{s}{\sqrt{n}} \quad \%E = \frac{s_m}{\bar{y}} \times 100$$

Tabla 3.11.1.
Reproducibilidad y seguridad del método. Cálculo de parámetros estadísticos.

Onda I		Onda II	
\bar{y} (I_{pr} , μA)	0.140	\bar{y} (I_{pr} , μA)	0.228
s	0.0025	s	0.0033
s_m	0.0008	s_m	0.0011
$\%E$	0.6	$\%E$	0.5

3.12. ESTUDIO DE LOS LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN.

El límite de detección, expresado como concentración o cantidad, viene dado por la medida más pequeña que puede ser detectada con una certeza razonable mediante un procedimiento analítico. Por otro lado, el límite de cuantificación o determinación puede definirse como la concentración o masa más pequeña que puede ser cuantificada con una fiabilidad razonable.

Recientemente, se ha puesto de manifiesto que los métodos tradicionales para la determinación del límite de detección y del límite de cuantificación, basados en las definiciones de la IUPAC y la ACS, no son satisfactorios (259). Así pues, en este trabajo se ha aplicado el criterio del límite de confianza superior (ULA) de una señal de blanco, que hace uso del valor crítico de la distribución t y del error estándar de la estimación por regresión. De esta forma:

$$y_D = \hat{y}(x = 0) + t(v, \alpha) s(\hat{y}_0)$$

$$y_Q = \hat{y}(x = 0) + 3 t(v, \alpha) s(\hat{y}_0)$$

siendo y_D la señal correspondiente al límite de determinación, y_Q la señal correspondiente al límite de cuantificación, $\hat{y}(x = 0)$ el valor de señal estimado por regresión para una concentración de analito igual a cero, $t(v, \alpha)$ la t-STUDENT para v grados de libertad y un nivel de significación α y $s(\hat{y}_0)$ la desviación típica del valor de señal estimado por regresión para una concentración de analito igual a cero.

Una manera eficiente de conseguir un valor fiable de $s(\hat{y}_0)$ consiste en promediar las varianzas de la señal correspondiente a diferentes patrones de calibración, cada una de las cuales es ponderada según el número de grados de libertad asociado. Para ello, es necesario realizar medidas replicadas para cada uno de los patrones de calibración. En tal caso:

$$s_p^2 = \frac{n(k-1)s^2(1) + (n-2)s^2(2)}{n(k-1) + (n-2)}$$

donde s_p^2 es la desviación típica global de las medidas de los diferentes patrones y de sus correspondientes replicados, k designa el número de medidas replicadas para el i -ésimo patrón de calibración y n designa el número de patrones. Las varianzas $s^2(1)$ y $s^2(2)$ se obtienen como:

$$s^2(1) = \frac{\sum_i^n \sum_j^k (y_{ij} - \bar{y}_i)^2}{n(k-1)} \quad s^2(2) = \frac{k}{n-2} \sum_i^n (\bar{y}_i - \hat{y}_i)^2$$

donde \bar{y}_i representa la media aritmética de las medidas replicadas para el patrón i -ésimo, \hat{y}_i es el valor de señal estimado mediante regresión lineal. Finalmente, la varianza de la línea de regresión es:

$$s^2(\hat{y}) = \frac{s_p^2}{nk} + \frac{s_p^2}{n \sum_i^n (x_i - \bar{x})^2} (x - \bar{x})^2$$

donde \bar{x} es la media de los valores de concentración de los patrones de calibración.

Por último, el valor de t se obtiene para un nivel de significación α , habitualmente del 95 % y para un número de grados de libertad ν , igual a $n(k-1)+(k-2)$.

Se realizaron medidas por PPD para 8 muestras cuyas señales resultaron estar comprendidas entre 1 y 30 veces la señal de blanco, efectuando ocho replicados de cada medida. En la tabla 3.12.1 se encuentran los valores de intensidad de pico medios para la primera onda de reducción de la dibucaína y en la figura 3.12.1 se han representado dichos valores. En la tabla 3.12.2 se encuentran los resultados de la calibración junto con los límites de detección y cuantificación.

Tabla 3.12.1.
Cálculo del límite de detección y cuantificación. Valores de intensidad de pico medios obtenidos de la medida de ocho replicados de cada concentración.

C(M)	I _p (μA) medio
1×10 ⁻⁶	0.0391
4×10 ⁻⁶	0.0683
5×10 ⁻⁶	0.0853
1×10 ⁻⁵	0.1411
2×10 ⁻⁵	0.2292
4×10 ⁻⁵	0.4346
5×10 ⁻⁵	0.5260
1×10 ⁻⁴	1.0304

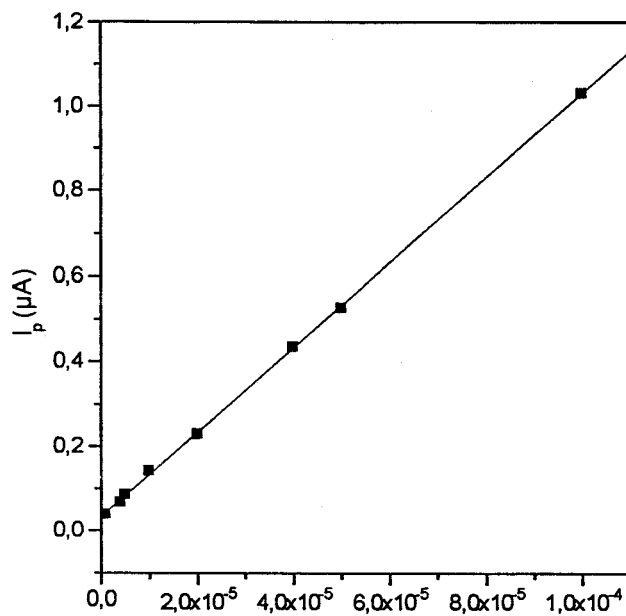


Figura 3.12.1.
Calibración de la determinación de dibucaína (cada punto es el promedio de 8 replicados)

Tabla 3.12.2.
Límites de detección y cuantificación, y parámetros de regresión para la determinación de dibucaína por PPD.

Qo	0.0327
Q1	9966.9
R	0.9998
LOD	3.8×10^{-7} M
LOQ	1.1×10^{-6} M

3.13. ESTUDIO DE INTERFERENCIAS.

Para estudiar las posibles interferencias de otras especies químicas como cationes, compuestos orgánicos y otros anestésicos locales en la determinación de dibucaína por el método propuesto, se prepararon una serie de muestras de concentración en dibucaína de 10^{-5} M en las condiciones descritas en el apartado 3.10, a las que se añaden cantidades variables de las especies extrañas para establecer su nivel de interferencia.

En la tabla 3.13.1 se encuentran los resultados obtenidos, tomando como criterio que existe interferencias cuando el porcentaje de error encontrado es superior al 5 %.

Tabla 3.13.1.
Estudio de interferencias en la determinación de la dibucaína.

Relación especie extraña/ dibucaína	Especies extrañas
1000	Li^+ , Na^+ , K^+ , Be^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Ag^+ , Al^{3+} , Cr^{3+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Hg^{2+} , Rb^+ , Zn^{2+} , Sb (III), As (V), Ba^{2+} , Mo (VI), Sr^{2+}
100	A. salicílico, a. cetoglutárico, butanol, etanol, metanol, D-glucosa, a. oxálico, propilen-glicol, AEDT, oxalacético, lidocaína y prilocaína.
50	Ni^{2+} , As^{3+}

A la vista de estos resultados se puede afirmar que el método propuesto es bastante selectivo ya que presenta un buen nivel de tolerancia tanto para compuestos

inorgánicos como para compuestos orgánicos de naturaleza alcohólica o ácida, así como para la presencia de otros anestésicos locales.

3.14. APLICACIONES.

Con el fin de conocer la utilidad del método propuesto en esta Memoria, se aplicó a la determinación de dibucaína en preparaciones farmacéuticas que la contienen en forma de pomadas y se compararon los resultados obtenidos con los conseguidos por otro método propuesto por la farmacopea estadounidense basado en la técnica de HPLC (260).

La determinación se realizó en tres pomadas comercializadas en España: Ultraproct, Scheriproct y Ruscus Llorens. La pomada Scheriproct contiene prednisola, clorhidrato de dibucaína y mentol. La pomada Ultraproct contiene fluocortolona, caproato, pivarato de fluocortolona, clorhidrato de dibucaína y undecilato de clemizol. La pomada Ruscus Llorens contiene ruscogeninas, prednisolona, clorhidrato de dibucaína, mentol y óxido de zinc.

Antes de aplicar el método propuesto se extrajo la dibucaína de las pomadas utilizando diferentes disolventes como metilisobutilcetona, tetracloruro de carbono, tricloroacético, diclorometano, pentano, etanol, agua y cloroformo, encontrándose el cloroformo como mejor de todos ellos. Se comprobó que la dibucaína se extraía mejor en medio ácido por lo que se utilizaron ácido clorhídrico y ácido fosfórico, comprobándose, entonces, que con ácido fosfórico la extracción era más eficiente. Se probaron, a continuación, distintas cantidades de ácido fosfórico a distintas concentraciones, así como, distintas cantidades de cloroformo. Todas estas experiencias sirvieron para optimizar un nuevo método de extracción y determinación de dibucaína en pomadas, que se describe a continuación:

Se pesa aproximadamente 1 g de pomada y se disuelve en 45 ml de cloroformo. Esta disolución se lleva a un embudo de decantación de 250 ml, añadiéndose, a continuación, 10 ml de agua Milli-Q y 20 ml de ácido fosfórico 0.1 M.

Se agita durante 10 min y se separa la fase acuosa. Después se añaden en el embudo, sobre la fase orgánica, otros 10 ml de agua Milli-Q y 10 ml de ácido fosfórico 0.1 M. Se agita durante otros 10 min y se vuelve a extraer la fase acuosa. Sobre la fase orgánica se añaden 10 ml de agua Milli-Q y 5 ml de ácido fosfórico 0.1 M y se agita durante 5 min y se separa de nuevo la fase acuosa. Por último, se añaden 10 ml de agua Milli-Q, se agita durante 5 min y se extrae la fase acuosa. Se unen todas las fases acuosas extraídas y en un matraz de 100 ml se añade tampón fosfato 0.2 M, obteniéndose un pH de 2.6. Se enrasa, por último, con agua Milli-Q.

Se comprobó que se obtenían mejores resultados utilizando adición estándar para lo cual, se preparó un patrón de concentración 0.1 M de dibucaína pesándose 0.1899 g de clorhidrato de dibucaína, añadiéndose después, 1 ml de tampón fosfórico 2 M y 1.75 ml de ácido fosfórico 0.1 M y enrasándose hasta 5 ml con agua Milli-Q.

En el caso de la pomada Ruscus Llorens se observó que no se disolvía bien ni en éter (utilizado en la farmacopea) ni en cloroformo. Este problema se resolvió al añadir ácido clorhídrico 0.1 M (tal y como se utiliza en la farmacopea) o ácido fosfórico 0.1 M (tal y como se utiliza en el método propuesto). En los otros casos no se presentaron problemas dignos de mención.

El método propuesto por la farmacopea estadounidense basado en la técnica de HPLC se utilizó preparando una recta de calibrado con cinco patrones cuyas concentraciones variaban desde 2.45×10^{-4} M a 9.82×10^{-4} M.

En la tabla 3.14.1 se recogen los resultados obtenidos para las distintas pomadas.

Tabla 3.14.1.
Determinación de dibucaína en pomadas. Los valores se encuentran expresados en mg.

Muestra	PPD (mg de dibucaína)*	HPLC (mg de dibucaína)*
Ultraproct	5.10±0.06	4.97±0.07
Scheriprot	4.98±0.05	4.87±0.05
Ruscus Llorens	4.90±0.01	4.82±0.05

- Media de tres determinaciones

La comparación de ambos métodos se realiza estableciendo como hipótesis nula que la diferencia entre los valores medios obtenidos por cada uno de los métodos, no difiere significativamente de cero, teniendo en cuenta que sus desviaciones estándar no diferían de forma significativa. Así pues, y aplicando las siguientes ecuaciones:

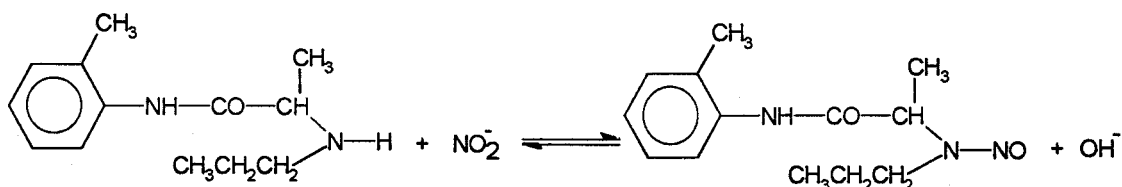
$$s^2 = \frac{\{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2\}}{(n_1 + n_2 - 2)}$$

$$t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{s \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

Se calcula el valor de s (desviación estándar ponderada) para cada una de las pomadas, 0.065, 0.050, 0.036, respectivamente. El valor de t obtenido para cada uno de los fármacos a partir del valor de s es 2.45, 2.69 y 2.72, respectivamente. El valor crítico de |t| (v=4, P=0.05) es 2.78, mayor que los obtenidos experimentalmente, con lo que se acepta la hipótesis nula y, por tanto, no hay diferencia significativa entre los resultados obtenidos por el método propuesto y los obtenidos por el método oficial.

CAPÍTULO IV
ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO
POLAROGRÁFICO DE LA
NITROSAMINA DE LA PRILOCAÍNA.
DETERMINACIÓN DE PRILOCAÍNA
POR POLAROGRAFÍA DIFERENCIAL
DE PULSO.

En los ensayos previos realizados sobre el comportamiento polarográfico de la prilocaína (2-(propilamino)-*o*-propionotoluidina) se observó que ésta no se reduce sobre el electrodo de mercurio, por lo que, se procedió a la obtención de un derivado oxidado que se pueda reducir en dicho electrodo. Teniendo en cuenta que la prilocaína posee en su molécula un grupo de amina secundaria, se eligió la nitrosación como reacción para obtener el derivado oxidado.



Para llevar a cabo esta reacción se siguió el procedimiento descrito por Davídek y Manousek para la nitrosación del resorcinol (261), aunque se realizaron una serie de cambios para el procedimiento inicial.

En la figura 4 se muestran los polarogramas tast y PPD correspondientes a una muestra de la nitrosamina de la prilocaína, preparada mediante el siguiente procedimiento. A 0.5 ml de solución metanólica de 10^{-4} M en clorhidrato de prilocaína se añade 0.5 ml de metanol, 4 ml de nitrito potásico 3 M y 6 ml de ácido fosfórico 2 M añadidos muy lentamente, mediante la utilización de una bureta de 10 ml, utilizando un flujo aproximado de 0.01 ml/s. Se pasa nitrógeno durante 3 min., se añade a continuación 2 ml de hidróxido sódico 2.5 M. Las muestras así preparadas de pH 3.5, fueron trasvasadas a la celda polarográfica donde se les pasó nitrógeno durante 10 min., tras los cuales se registraron los polarogramas entre -0.70 y -1.10 V tanto por tast como por PPD, fijando como condiciones operacionales 1 s de tiempo de goteo y -50 mV de amplitud de pulso en el caso de PPD. En los polarogramas obtenidos se observa la aparición de una onda con un potencial de onda media de -0.86 V mediante polarografía tast y un máximo en el polarograma de PPD a -0.875 V.

Se observa, además, en la onda registrada mediante la técnica tast la presencia de un pequeño máximo que fue eliminado probando cantidades variables de gelatina al 1 %. En la figura 4.1 se muestran los polarogramas registrados mediante polarografía tast para muestras de N-nitrosamina de prilocaína 10^{-4} M y pH 3.5 que contienen cantidades de 0, 0.1, 0.15 y 0.2 ml de gelatina al 1%, respectivamente. De los resultados obtenidos se deduce que la cantidad más apropiada de supresor para la

eliminación del máximo es 0.15 ml en gelatina 1%, ya que con esta cantidad no se pierde información de la onda y se elimina el máximo polarográfico.

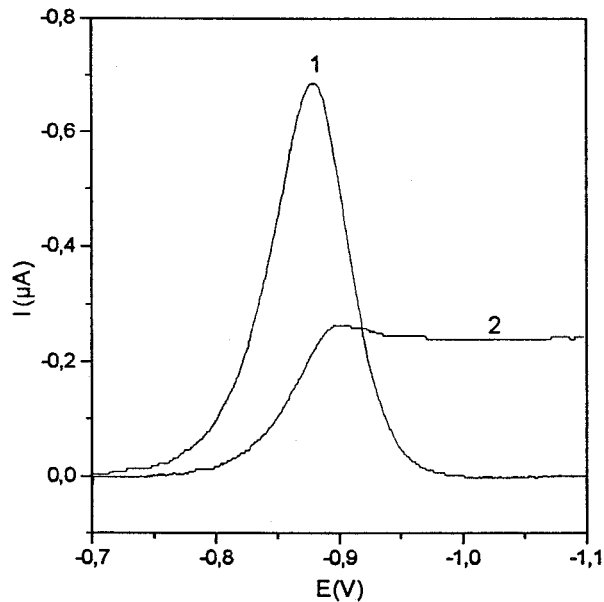


Figura 4.

Polarogramas correspondientes a una muestra de N-nitrosamina de prilocaína en una concentración de 10^{-4} M y un pH de 3.5. 1.- PPD, 2.- polarografía tast.

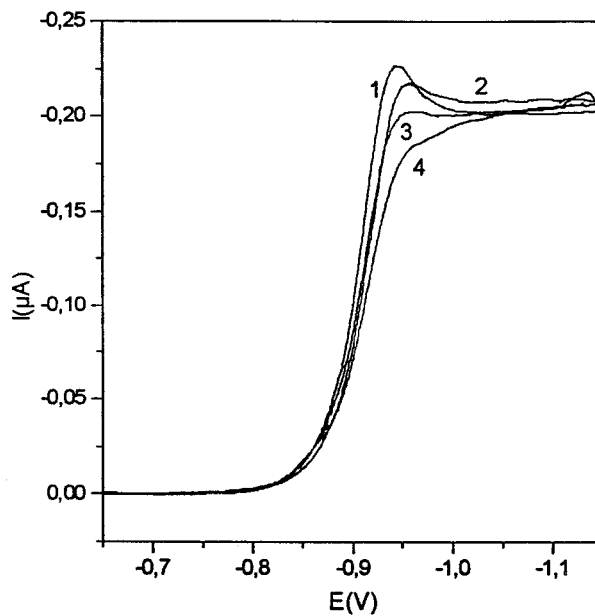


Figura 4.1.

Polarogramas obtenidos para muestras de N-nitrosamina derivada de la prilocaína de concentración 10^{-4} M y pH 3.5 que poseen cantidades variables de gelatina al 1%. 1.- sin gelatina, 2.- 0.1 ml de gelatina al 1%, 3.- 0.15 ml de gelatina al 1%, 4.- 0.2 ml de gelatina al 1%.

4.1 INFLUENCIA DE LA CANTIDAD DE ÁCIDO FOSFÓRICO EN LA ETAPA DE NITROSACIÓN.

A muestras que contenían prilocaína en concentración 10^{-4} M se les añadieron cantidades crecientes entre 1 y 8 ml de ácido fosfórico 2 M en la etapa de nitrosación. El resto del procedimiento de la preparación de las muestras fue tal y como se describe anteriormente. El pH de las muestras fue ajustado mediante hidróxido sódico 2.5 M a un valor de 3.5.

Las condiciones operacionales de medida fueron de 1 s para el tiempo de goteo, 5.1 mV/s para la velocidad de barrido y -50 mV de amplitud de pulso. Las muestras previamente desoxigenadas mediante el paso de nitrógeno durante 10 min fueron estudiadas por PPD y medidas sus intensidades de pico, cuyos valores para cada cantidad de ácido fosfórico se encuentran expuestos en la tabla 4.1.1. En la figura 4.1.1 se representa la intensidad de pico en función de los ml añadidos de ácido fosfórico 2 M.

Tabla 4.1.1.
Estudio de la influencia del volumen de ácido fosfórico añadido sobre la onda de reducción de la N-nitrosamina de la prilocaína.

ml de H_3PO_4 añadido	I_p (μA)
3	-0.681
4	-0.700
5	-0.703
6	-0.682
7	-0.681
8	-0.708

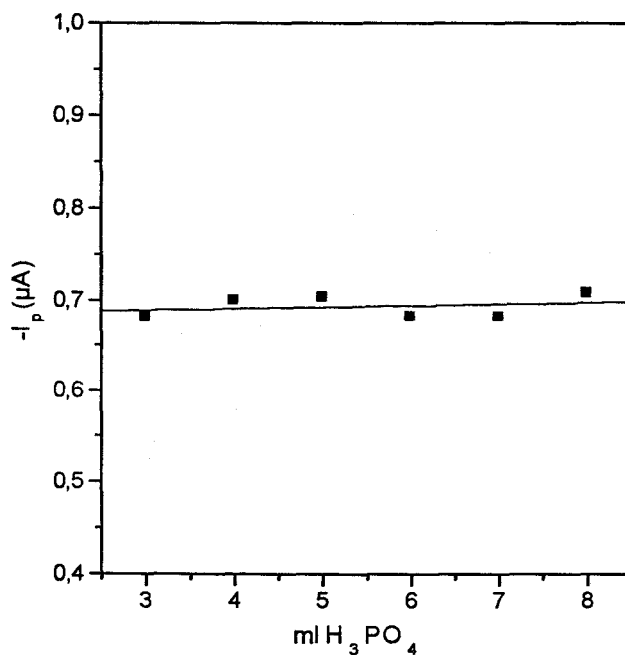


Figura 4.1.1.
Estudio de la influencia de la cantidad de ácido fosfórico añadido sobre la onda de reducción de la N-nitrosamina de la prilocaína.

Con 1 y 2 ml de ácido fosfórico añadido se obtienen ondas anchas y mal desarrolladas a potenciales más negativos que el que cabría esperar, lo que sugiere que a estos pequeños volúmenes de ácido fosfórico añadido no se ha dado por completo la reacción de nitrosación y la onda podría corresponder a la reducción del nitrito. La intensidad de pico no varía prácticamente al aumentar la cantidad de ácido fosfórico en el paso de nitrosación, por lo que, en el método de preparación de la muestra se puede seguir utilizando 6 ml de ácido fosfórico 2 M.

4.2 INFLUENCIA DE LA CANTIDAD DE NITRITO SÓDICO EMPLEADO EN EL PASO DE NITROSACIÓN.

Las muestras fueron preparadas tal y como se indica anteriormente, salvo la cantidad de nitrito sódico 3 M añadida, que variaba desde 0.5 a 7 ml, en el paso de

nitrosación. Todas las muestras preparadas de esta forma contenían una concentración de prilocaína de 10^{-4} M y un pH de 3.5.

Las muestras se trasvasaron a la celda polarográfica donde se desoxigenaron por paso de una corriente de nitrógeno durante 10 min, tras los cuales se registraron los polarogramas por PPD correspondientes a 1 s de tiempo de goteo, 5.1 mV/s de velocidad de barrido y -50 mV de amplitud de pulso.

Los resultados obtenidos de intensidad de pico para cada cantidad de nitrito sódico añadido están recogidos en la tabla 4.2.1. Al superarse una cantidad de nitrito sódico 3 M de 4 ml, el pico correspondiente a nuestro compuesto es muy ancho y poco definido, apareciendo dos ondas a partir de 7 ml, lo que indica que a partir de una determinada cantidad de nitrito sódico éste no reacciona totalmente con la prilocaína quedando un exceso en disolución que se reduce a análogos potenciales que la N-nitrosamina y, por tanto, interfiere con la onda del compuesto objeto de estudio. Para posteriores estudios escogemos la cantidad de 2 ml de nitrito sódico en el paso de nitrosación. A partir de 4 ml aparecen problemas en la definición de la onda.

Tabla 4.2.1
Influencia de la cantidad de nitrito sódico añadido en el paso de nitrosación.

ml de NaNO_2 añadido	$I_p(\mu\text{A})$
0.5	-0.261
1.0	-0.571
2.0	-0.601
3.0	-0.657
4.0	-0.682
5.0	-0.806
6.0	-1.540
7.0	-0.619
	-1.203

Con el fin de comprobar si esta misma cantidad de nitrito sódico propuesta es válida para nitrosar cantidades más bajas de prilocaína, se procedió a seguir el mismo procedimiento en muestras de prilocaína de concentración 10^{-6} M.

En la tabla 4.2.2 se encuentran los valores de intensidad de pico para la onda de reducción de la N-nitrosamina derivada de la prilocaína y las correspondientes cantidades añadidas de nitrito sódico 3 M que ratifican la elección de 2 ml. Por encima de 4 ml aparecen dos ondas.

Tabla 4.2.2
Influencia de la cantidad de nitrito sódico en muestras de prilocaína 10^{-6} M.

ml de NaNO_2 añadido	$I_p(\mu\text{A})$
0.5	-0.010
1	-0.014
2	-0.016
3	-0.017
4	-0.018

4.3 INFLUENCIA DE LA CANTIDAD DE METANOL EN EL PASO DE NITROSACIÓN.

Las muestras fueron preparadas tal y como se indica anteriormente empleando 2 ml de nitrito sódico 3 M en lugar de los 4 ml que aparecen en dicho procedimiento y añadiendo cantidades variables de metanol, entre 0 y 8 ml, a cada una de ellas. Éstas poseían una concentración de 10^{-4} M en prilocaína y pH 3.5.

Las condiciones operacionales utilizadas para el registro de los polarogramas por PPD fueron las mismas que en los apartados anteriores.

En la tabla 4.3.1 aparecen los valores de intensidad de pico correspondientes a muestras que se diferenciaban en la cantidad de metanol añadida en la etapa de nitrosación en la que se observa que la intensidad de pico va decreciendo a medida que se aumenta la cantidad de metanol añadido. En polarogramas registrados mediante la técnica *tast*, sin supresor de máximos, se ha comprobado como al aumentar la cantidad de metanol añadido el máximo polarográfico va disminuyendo. En los estudios posteriores se emplearon 0.5 ml de metanol.

Tabla 4.3.1
Estudio de la influencia de la cantidad de metanol añadido en la etapa de nitrosación.

ml de metanol añadido	I_p (μA)
0.0	-0.652
0.5	-0.599
1.0	-0.637
2.0	-0.596
3.0	-0.571
4.0	-0.499
5.0	-0.486
6.0	-0.459
8.0	-0.391

4.4 INFLUENCIA DE LA VELOCIDAD DE ADICIÓN DEL ÁCIDO FOSFÓRICO DURANTE LA ETAPA DE NITROSACIÓN.

En ensayos previos realizados se observó la influencia que ejercía la velocidad con la que era añadido el ácido fosfórico para la nitrosación de la prilocaína, comprobándose que la intensidad de pico correspondiente a la onda de reducción de la N-nitrosamina formada aumentaba considerablemente cuando el ácido era añadido muy lentamente. Con el fin de llevar a cabo más detalladamente este estudio se prepararon muestras siguiendo el procedimiento descrito anteriormente pero añadiendo 2 ml de nitrito sódico 3 M y 0.5 ml de metanol.

En la tabla 4.4.1 se encuentran los valores obtenidos de intensidad de pico según la velocidad de flujo empleada en la adición del ácido fosfórico 2 M y se han representado en la figura 4.4.1.

Tabla 4.4.1.
Influencia de la velocidad de adición del ácido fosfórico sobre la onda de reducción de la N-nitrosamina de la prilocaína.

V_{flujo} (ml/s)	I_p (μA)
0.128	-0.246
0.059	-0.339
0.037	-0.360
0.027	-0.417
0.021	-0.513
0.017	-0.565
0.015	-0.579
0.013	-0.589
0.008	-0.590

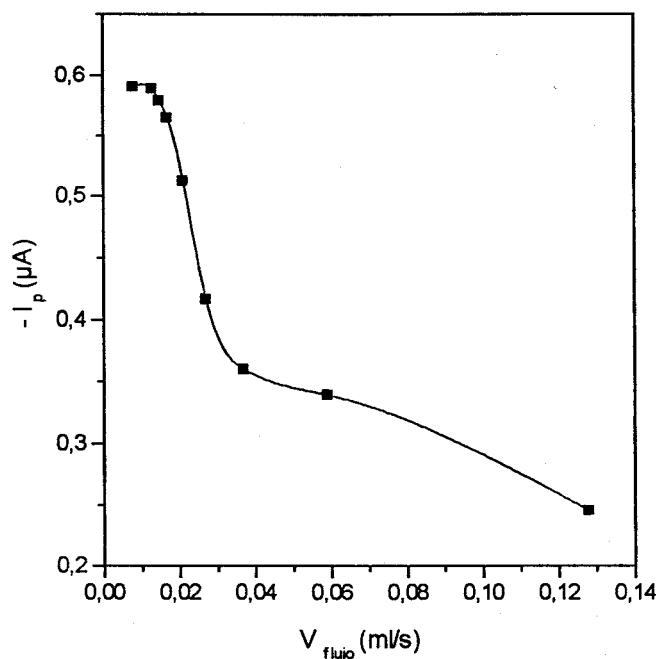


Figura 4.4.1.
Influencia de la velocidad de adición del ácido fosfórico sobre la onda de reducción de la N-nitrosamina de la prilocaína.

Tal y como se observa en la figura a medida que disminuye la velocidad de adición del ácido fosfórico en la etapa de nitrosación la intensidad de pico aumenta. A partir de una velocidad de flujo de 0.027 ml/s el aumento de la intensidad de pico parece hacerse más acusado. Para posteriores estudios se siguió utilizando una

velocidad de flujo de 0.01 ml/s por considerarla como adecuada para la obtención de una buena altura de pico.

4.5 INFLUENCIA DEL TIEMPO DE PASO DE NITRÓGENO DURANTE LA REACCIÓN DE NITROSACIÓN.

Siguiendo el procedimiento propuesto en el apartado anterior se preparan las muestras con una concentración en prilocaína de 10^{-4} M y un pH de 3.5. En la etapa de preparación de la muestra se variaron los tiempos de paso de nitrógeno entre 0 y 480 s.

Los resultados de intensidad de pico encontrados a través del análisis de la altura de pico de la onda de reducción en función del tiempo de adición de nitrógeno son mostrados en la tabla 4.5.1 y su representación en la figura 4.5.1.

Tabla 4.5.1.
Estudio de la influencia del tiempo de paso de nitrógeno durante la etapa de nitrosación.

$t_{\text{adición de nitrógeno (s)}}$	$I_p (\mu A)$
0	-0.487
120	-0.597
180	-0.598
240	-0.598
360	-0.607
480	-0.602

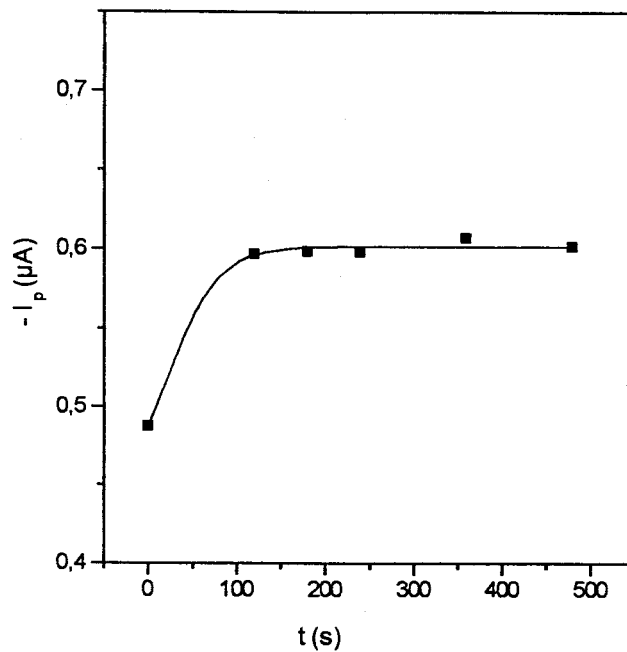


Figura 4.5.1.
Representación de la intensidad de pico en función del tiempo paso de nitrógeno durante la etapa de nitrosación.

A partir de 2 min. la intensidad de pico permanece prácticamente constante, por lo que, se fijan, como tiempo paso de nitrógeno, 3 min. sin variar el procedimiento establecido inicialmente.

4.6 INFLUENCIA DEL pH.

Para la preparación de las muestras con las que se llevan a cabo este estudio se sigue el siguiente procedimiento: a 2,5 ml de solución metanólica de prilocaína 10^{-3} M se le añaden 0.5 ml de metanol, 2ml de nitrito sódico y 6 ml de ácido fosfórico 2 M, añadido este último gota a gota con una velocidad aproximada de 0.01 ml/s, agitando la solución vigorosamente. Una vez concluida la adición de ácido fosfórico se deja pasar nitrógeno durante 3 min., tras los cuales se añade hidróxido sódico 2.5 M en cantidad adecuada según el valor de pH deseado. Por último se completa con agua Milli-Q hasta completar un volumen de 25 ml.

Las muestras así preparadas con valores de pH que oscilan entre 1.5 y 8.5 se llevan a la celda polarográfica donde se les hace pasar nitrógeno durante 10 min. tras los cuales se registran los polarogramas mediante PPD barriendo desde -0.6 a -1.250 V. Se emplearon las condiciones operacionales de 1 s. para el tiempo de goteo, de -50 mV para la amplitud de pulso y una velocidad de barrido de 5.1 mV/s.

En la tabla 4.6.1 aparecen los valores obtenidos de potencial e intensidad de pico para todo el rango de pH estudiados. Estos valores se han representado en función del pH en las figuras 4.6.1 y 4.6.2.

Tabla 4.6.2.
Estudio el pH. Valores del potencial e intensidad de pico para la onda de reducción de la N-nitrosamina derivada de la prilocaína a distintos valores de pH.

pH	E_p (V)	I_p (μ A)
1.50	-0.65	-0.352
2.20	-0.74	-0.429
2.39	-0.74	-0.505
2.74	-0.78	-0.526
3.2	-0.84	-0.554
3.50	-0.86	-0.600
4.11	-0.89	-0.571
4.70	-0.95	-0.475
5.32	-1.01	-0.419
5.78	-1.03	-0.418
6.35	-1.07	-0.414
8.30	-1.21	-0.035

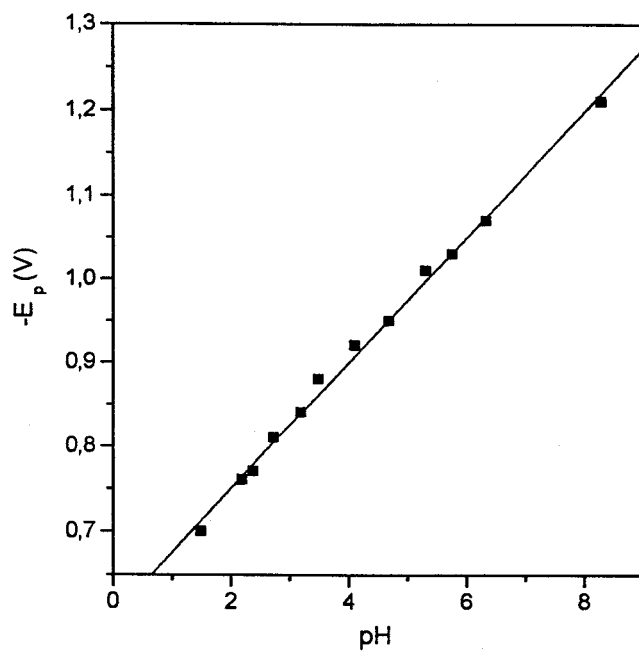


Figura 4.6.1.
Estudio del pH. Variación del potencial de pico con el pH para la onda de reducción de la N-nitrosamina derivada de la prilocaína.

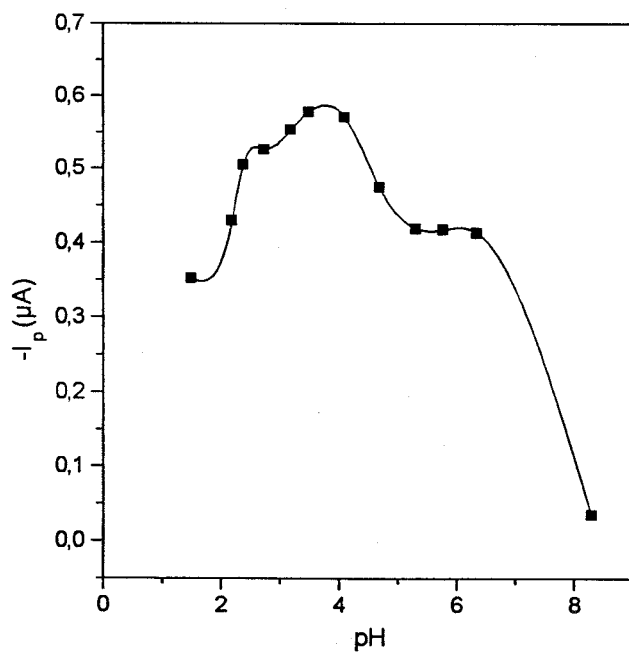
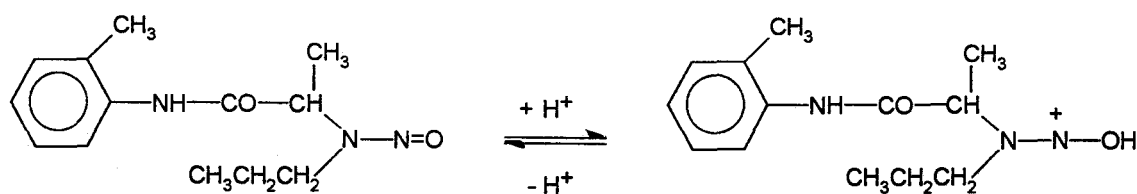


Figura 4.6.2.
Estudio del pH. Variación de la intensidad de pico en función del pH para la onda de reducción de la N-nitrosamina derivada de la prilocaína.

Como puede apreciarse en la figura 4.6.1, los valores de potencial de pico se desplazan hacia valores más negativos a medida que aumenta el pH, observándose una dependencia lineal entre esta magnitud y el pH. Dependencia que indica la intervención de los protones en el proceso de reducción de la N-nitrosamina de la prilocaína. Esta dependencia lineal viene dada por la ecuación:

$$-E_p = 0.6012 + 0.0746 \text{ pH}, \quad r=0.9978$$

y puede ser debida a la protonación del grupo nitroso que es reducido en el electrodo de mercurio.



Por otra parte, la intensidad de pico alcanza un máximo para valores de pH entre 3.0-4.0, y por esta razón se ha escogido el valor de pH de 3.5 para la realización de estudios posteriores.

4.7 INFLUENCIA DEL TAMAÑO DE GOTA DE MERCURIO.

Las muestras que fueron preparadas tal y como se describe en el apartado anterior, eligiendo para ellas un pH de 3.5. Se registraron los correspondientes polarogramas mediante PPD variando el tamaño de gota entre 0.25 y 0.52 mm² y utilizando 1 s como tiempo de goteo y -50 mV como amplitud de pulso.

Los valores de potencial e intensidad de pico para cada valor de área de gota estudiada están recogidos en la tabla 4.7.1. A medida que aumenta el tamaño de gota el potencial de pico permanece constante, mientras que la intensidad de pico aumenta de forma lineal con el área de la gota de mercurio. Los estudios posteriores a éste se

realizarán empleando un tamaño de gota correspondiente a un valor de 0.52 mm^2 , siendo este tamaño de gota la mayor posible que se puede obtener con la instrumentación utilizada.

Tabla 4.7.1.
Estudio de la influencia del tamaño de gota en el potencial e intensidad de pico para la onda de reducción de la N-nitrosamina de la prilocaína.

Tamaño gota mm^2)	E_p (V)	I_p (μA)
0.25	-0.88	-0.263
0.40	-0.88	-0.434
0.52	-0.88	-0.601

4.8 INFLUENCIA DEL TIEMPO DE GOTEO.

Se prepararon muestras de concentración 10^{-4} M en la N-nitrosamina de la prilocaína y pH 3.5 en las condiciones óptimas establecidas hasta ahora y se trasvasaron a la celda polarográfica donde se registraron los polarogramas mediante PPD en las condiciones operacionales ya definidas

Los valores de intensidad de pico y de tiempo de goteo, así como aquellos obtenidos utilizando la expresión $t^{2/3}$ vienen recogidos en la tabla 4.8.1. En la figura 4.8.1 se ha representado la intensidad de pico en función del $t^{2/3}$.

Tabla 4.8.1.
Influencia del tiempo de goteo en la onda de reducción de la N-nitrosamina de la prilocaína.

t_g (s)	$t_g^{2/3}$	I_p (μA)
0.5	0.630	-0.478
0.7	0.788	-0.522
0.9	0.932	-0.576
1.0	1.000	-0.600
1.1	1.066	-0.616
1.3	1.191	-0.653
1.5	1.310	-0.698
1.7	1.424	-0.731
1.9	1.534	-0.767
2.0	1.692	-0.807

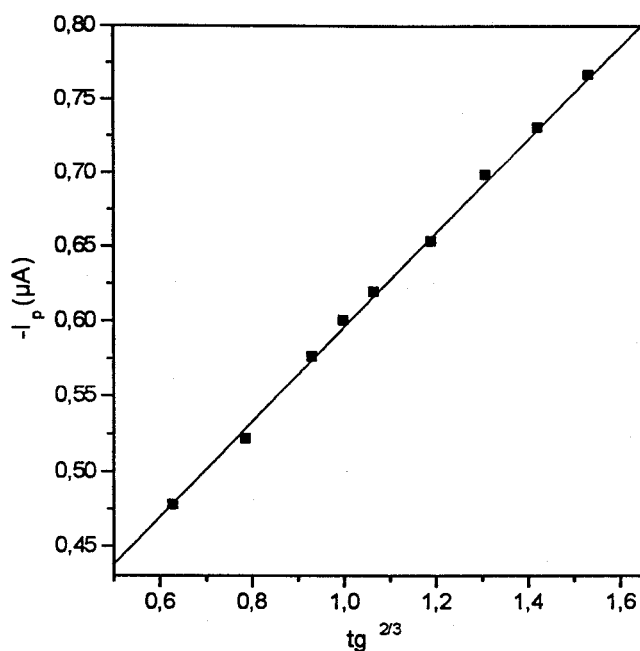


Figura 4.8.1.
Estudio de la influencia del tiempo de goteo. Variación de la intensidad de pico con $t_g^{2/3}$.

A medida que aumenta el tiempo de goteo. Este aumento es lineal siendo su ecuación:

$$-I_p = 0.282 + 0.3154t_g^{2/3} \quad r=0.9991.$$

El carácter lineal de la representación de la intensidad de pico en función de $t_g^{2/3}$ hace pensar que la onda de reducción correspondiente a la N-nitrosamina derivada de la prilocaína se debe fundamentalmente a un proceso controlado por difusión.

4.9 INFLUENCIA DE LA AMPLITUD DE PULSO APLICADO.

Para llevar a cabo este estudio se prepararon igualmente muestras de prilocaína de concentración 10^{-4} M y pH 3.5.

Las condiciones de operación fijadas fueron de 1s para el tiempo de goteo y 0.52 mm^2 de área de gota de mercurio y se registraron los polarogramas mediante PPD correspondientes a distintos valores de amplitud de pulso que oscilaban entre -10 y -300 mV.

Los valores tanto de intensidad como de potencial de pico y de amplitud de pulso se recogen en la tabla 4.9.1 y en la figura 4.9.1 se muestra la variación de la intensidad de pico en función de la amplitud de pulso aplicada.

Tabla 4.9.1.
Estudio de la influencia de la amplitud de pulso aplicado en la medida de la onda de reducción de la N-nitrosamina derivada de la prilocaína.

$-\Delta E(\text{mV})$	$I_p(\mu\text{A})$	$E_p(\text{mV})$
10	-0.079	-925
20	-0.169	-920
30	-0.297	-915
40	-0.444	-910
50	-0.602	-905
60	-0.795	-900
70	-1.018	-880
80	-1.243	-873
90	-1.473	-870
100	-1.607	-865
110	-1.819	-860
120	-2.074	-850
130	-2.236	-840
140	-2.337	-830
150	-2.453	-825
170	-2.615	-810
200	-2.713	-790
250	-2.782	-730
300	-2.837	-690

El potencial de pico se desplaza ligeramente hacia valores más positivos de potencial a medida que aumenta la amplitud de pulso aplicado. Este desplazamiento se hace más acusado a valores de amplitud muy altos como -250 y -300 mV.

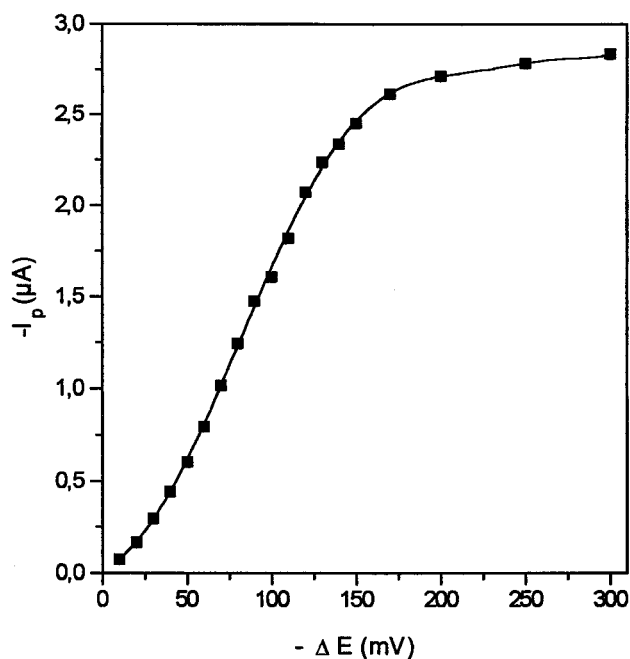


Figura 4.9.1.
Variación de la intensidad de pico con la amplitud de pulso aplicado.

A medida que aumenta la amplitud de pulso aplicado la altura de la onda crece, estabilizándose a altos valores de amplitud de pulso entre -150 y -300 mV.

En posteriores estudios se escogió una amplitud de pulso de -50 mV que proporciona una buena sensibilidad y resolución.

4.10 INFLUENCIA DE LA VELOCIDAD DE BARRIDO.

Se prepararon muestras con una concentración de 10^{-4} M en N-nitrosamina de la prilocaína y pH 3.5. Las condiciones de medida fijadas fueron de 1 s para el tiempo de goteo, 0.52 mm^2 de área de gota y -50 mV de amplitud de pulso. En cada medida fue variada la velocidad de barrido desde 2.55 a 20.00 mV/s.

Los valores obtenidos de intensidad de pico al variar la velocidad de barrido se exponen en la tabla 4.10.1. Se observa que a medida que aumenta la velocidad de barrido la intensidad de pico disminuye ligeramente, existiendo una relación lineal entre ambas magnitudes. La velocidad de barrido tomada para posteriores estudios será de 5.1 mV/s.

Tabla 4.10.1.
Estudio de la influencia de la velocidad de barrido. Valores de velocidad de barrido y de intensidad de pico.

V_b (mV/s)	I_p (μ A)
2.55	-0.605
5.10	-0.600
10.00	-0.595
20.00	-0.580

4.11 INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA.

Igualmente se prepararon muestras de concentración en N-nitrosamina de la prilocaína de 10^{-4} M y pH 3.5 en las condiciones óptimas establecidas y se registraron los polarogramas mediante PPD, variando la temperatura de la muestra entre (26.5 ± 1) y (60 ± 1) °C.

Los valores de intensidad de pico obtenidos para cada temperatura se encuentran recogidos en la tabla 4.11.1 y la representación del logaritmo de la intensidad frente a la temperatura se muestra en la figura 4.11.1.

Tabla 4.11.1.
Estudio de la influencia de la temperatura sobre la onda de reducción de la N-nitrosamina de la prilocaína. Valores de temperatura y de intensidad de pico.

T(°C)	I_p (μ A)
26.5	-0.607
33.3	-0.646
35.0	-0.678
40.0	-0.709
45.0	-0.756
50.0	-0.783
55.0	-0.795
60.0	-0.826

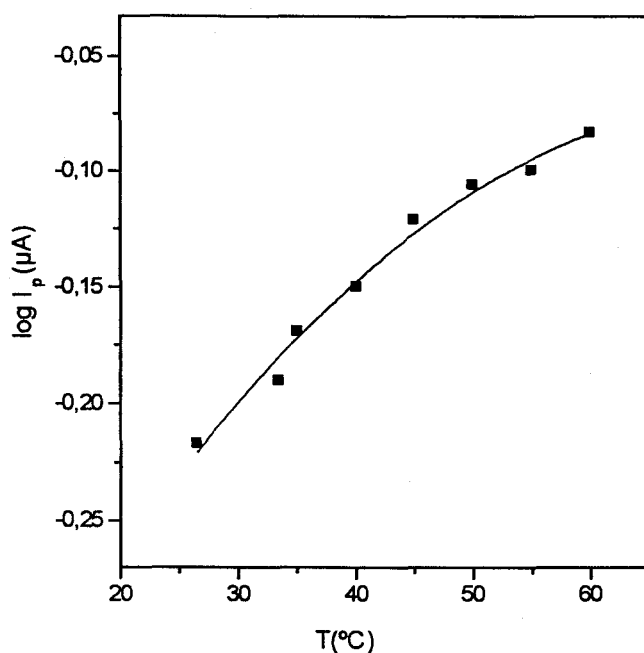


Figura 4.11.1.
Estudio de la influencia de la temperatura. Representación del logaritmo de la intensidad de pico frente a la temperatura.

A medida que aumenta la temperatura la intensidad de pico aumenta apreciándose una variación casi lineal entre ambas magnitudes. A través de los datos de temperatura e intensidad de pico se obtiene un coeficiente de temperatura medio de $1.04 \text{ } ^\circ\text{C}^{-1} \%$, lo que indica que el proceso, que controla la reducción es principalmente de difusión.

4.12 ESTUDIO DE LA REVERSIBILIDAD .

Este estudio se ha llevado a cabo empleando las técnicas tast, PPD y CV.

4.12.1 ESTUDIO DE LA REVERSIBILIDAD DE LOS PROCESOS MEDIANTE TAST.

Los criterios utilizados son: análisis logarítmico de la función intensidad-potencial y determinación del valor $E_{3/4}-E_{1/4}$.

Las muestras fueron preparadas de la siguiente forma: a 2.5 ml de solución metanólica de clorhidrato de prilocaína 10^{-3} M se le añaden 0.5 ml de metanol, 2 ml de nitrito sódico 3 M y 6 ml de ácido fosfórico 2 M, añadido este último gota a gota con una velocidad de flujo aproximada de 0.01 ml/s, agitando la solución vigorosamente. Una vez concluida la adición de ácido fosfórico se deja pasar nitrógeno durante 3 min., tras los cuales se añade hidróxido sódico 2.5 M en cantidad adecuada según el valor de pH deseado. Por último, se completa con agua Milli-Q hasta un volumen de 25 ml.

Las muestras así preparadas con valores de pH que oscilan entre 1.5 y 8.3, se llevan a la celda polarográfica donde se les hace pasar nitrógeno durante 10 min., tras los cuales se registran los polarogramas mediante polarografía tast. Se emplearon las condiciones operacionales de 1 s para el tiempo de goteo, 0.52 mm^2 de tamaño de gota y 5.1 mV/s de velocidad de barrido.

Los resultados obtenidos de potencial de semionda, intensidad límite y de $n_a\alpha$ para cada valor de pH se encuentran en la tabla 4.12.1.1.

Tabla 4.12.1.1.
Estudio de la reversibilidad de la onda de reducción del producto de oxidación de la prilocaína.

pH	$E_{1/2}$ (V)	I_l (μ A)	$n_a\alpha$
1.50	-0.733	-0.171	1.19
2.20	-0.796	-0.194	1.21
2.39	-0.807	-0.197	1.18
2.74	-0.836	-0.203	1.17
3.24	-0.878	-0.200	1.16
3.73	-0.920	-0.201	1.18
4.10	-0.943	-0.219	0.75
5.10	-1.014	-0.196	1.04
5.40	-1.025	-0.189	1.13
5.80	-1.052	-0.189	1.17
6.00	-1.071	-0.185	1.14
6.33	-1.093	-0.202	1.13
6.60	-1.110	-0.202	1.20
8.30	-1.262	-0.172	0.71
$n_a\alpha_{\text{medio}} =$			1.09 \pm 0.16

En esta tabla se observa como a pH 4.1 y 8.3 se obtienen los valores más bajos de $n_a\alpha$, siendo el resto prácticamente similares. Los valores de $n_a\alpha$ para estos pH muestran que el proceso es irreversible para cualquiera que sea el valor del número de electrones. El resto de los valores de $n_a\alpha$ para los diferentes pH también muestran que el proceso es irreversible pero considerando el número de electrones como 2.

En la tabla 4.12.1.2 se muestran los valores de la diferencia entre los potenciales $E_{3/4}-E_{1/4}$ para cada pH. En todos los casos la diferencia entre ambas magnitudes es mayor que $-0.059/n$, siendo n igual a 2, lo que corrobora que se trata de un proceso irreversible.

Tabla 4.12.1.2.
Valores de $E_{3/4}-E_{1/4}$ para cada valor de pH.

pH	$E_{3/4}-E_{1/4}$
1.50	0.050
2.20	0.048
2.39	0.050
2.74	0.058
3.24	0.056
3.73	0.053
4.10	0.057
5.10	0.049
5.40	0.049
5.80	0.047
6.00	0.048
6.33	0.052
8.30	0.048

4.12.2 ESTUDIO DE LA REVERSIBILIDAD DE LOS PROCESOS MEDIANTE PPD.

A) Criterio de R. L. Birke.(6)

En la figura 4.12.2.1 se encuentran los polarogramas correspondientes al barrido anódico y catódico (utilizando amplitud de pulso de +50 mV para el barrido

anódico y -50 mV para el barrido catódico) para una muestra de concentración 10^{-4} M de prilocaína a pH 3.5.

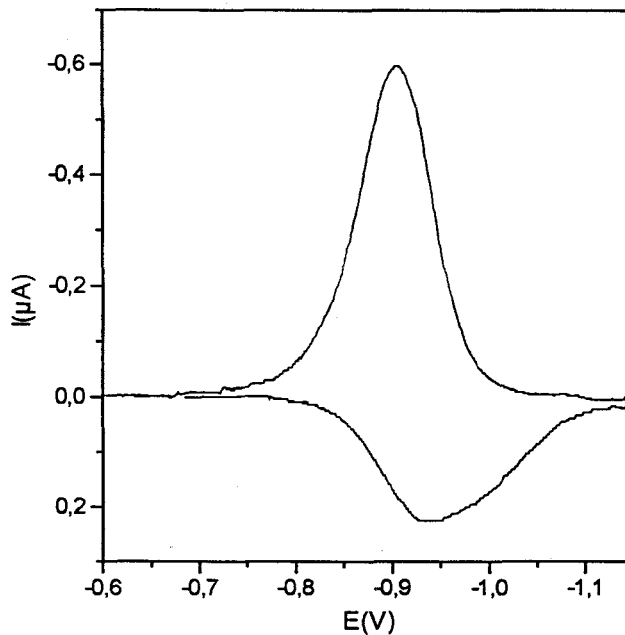


Figura 4.12.2.1.
Estudio de la reversibilidad mediante PPD. Criterio de Birke.

En la tabla 4.12.2.1 se muestran los valores de potencial e intensidad de pico correspondientes al barrido anódico y catódico. A través del análisis de los potenciales e intensidades de pico correspondientes al barrido anódico y catódico se tiene que el cociente entre la intensidad de pico anódica y catódica, $|I_p^a / I_p^c|$, es 0.37, valor que es menor que 1. Por lo que el proceso es irreversible. La diferencia entre el potencial de pico catódico y anódico, $E_p^c - E_p^a$, es 45 mV, valor que muestra que el proceso es irreversible.

Tabla 4.12.2.1.
Estudio de la reversibilidad mediante PPD. Valores de potencial e intensidad de pico anódico y catódicos.

Barrido anódico		Barrido catódico	
E_p^a (V)	I_p^a (μ A)	E_p^c (V)	I_p^c (μ A)
-0.960	0.221	-0.915	-0.597

B) Determinación de la anchura de medio pico $W_{1/2}$ cuando $\Delta E=0$.(7)

Para el estudio de la reversibilidad mediante este criterio se han utilizado los polarogramas correspondientes al apartado 4.9, midiendo en cada uno de ellos el valor de la anchura de medio pico para cada valor de amplitud de pulso utilizada. En la tabla 4.12.2.2 aparecen estos valores y en la figura 4.12.2.2 se representa la anchura de medio pico en función de la amplitud pulso aplicada.

Tabla 4.12.2.2.
Estudio de la reversibilidad mediante PPD. Valores de amplitud de pulso y anchura de medio pico para muestras de concentración 10^{-4} M en prilocaína y pH 3.5.

$-\Delta E$ (mV)	$W_{1/2}$ (mV)
10	90
20	80
30	80
40	80
50	80
60	80
70	70
80	70
90	70
100	80
110	80
120	80
130	80
140	90
150	90
170	90
200	100
250	110
300	110

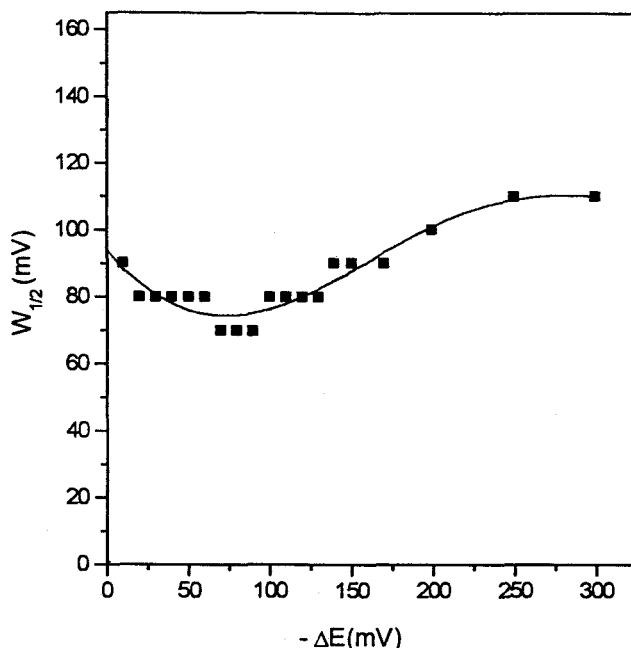


Figura 4.12.2.2.
Estudio de la reversibilidad mediante PPD. Representación de la anchura de medio pico en función de la amplitud de pulso.

Extrapolando en la gráfica para un valor de $\Delta E=0$ se obtiene un valor de anchura de medio pico de 93.26, valor que es mayor al correspondiente a un proceso reversible donde intervienen dos electrones, con lo que se concluye que el proceso responsable de la reducción de la N-nitrosamina derivada de la prilocaína es un proceso irreversible.

C) Variación de E_p con ΔE .(8)

De la misma forma que en el apartado anterior, se han utilizado los polarogramas correspondientes al estudio realizado en el apartado 4.9. En la figura 4.12.2.3 se muestra la representación del potencial de pico en función de la amplitud de pulso aplicada, en la que se observa que a medida que aumenta la amplitud de pulso aplicado el potencial de pico se desplaza hacia valores más positivos, existiendo una relación lineal entre ambas magnitudes que viene recogida en la siguiente ecuación:

$$-E_p = 942.68 - 0.8118\Delta E; r=0.996.$$

Se observa que el valor de la pendiente es mayor a 0.5, lo que demuestra que el proceso de reducción es un proceso irreversible.

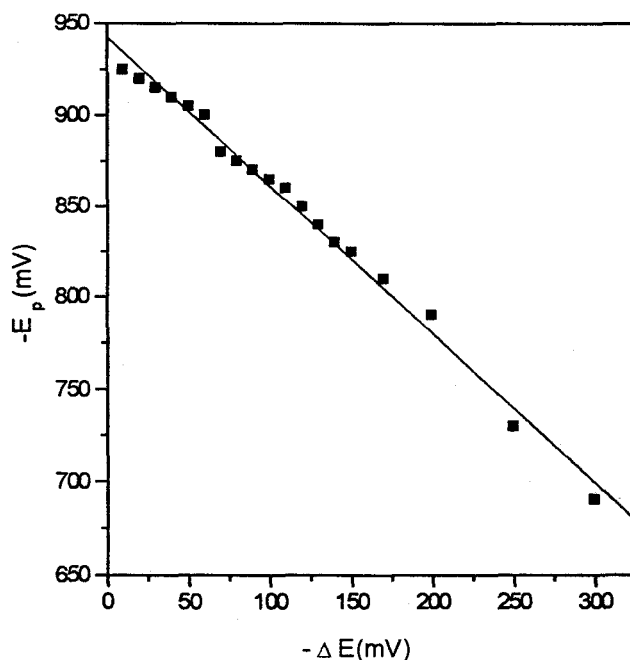


Figura 4.12.2.3.
Estudio de la reversibilidad mediante PPD. Variación del potencial de pico en función de la amplitud de pulso aplicada para la onda de reducción de la N-nitrosamina derivada de la prilocaína.

D) Relación entre I_p y $\sigma-1/\sigma+1$.(8)

A partir de los datos ΔE mostrados en el apartado 4.9 del presente capítulo se deduce el valor de $\sigma-1/\sigma+1$ para cada valor de intensidad de pico de la onda de reducción de la N-nitrosamina derivada de la prilocaína.

Considerando a n como 2 (siendo n el número de electrones intercambiados en el proceso de reducción de la especie electroactiva) se obtienen los valores de σ , y por consiguiente de $\sigma-1/\sigma+1$, que son mostrados en la tabla 4.12.2.4 junto con los correspondientes valores de I_p y ΔE .

Tabla 4.12.2.4.
Estudio de la reversibilidad por PPD. Relación entre I_p y $\sigma-1/\sigma+1$.

$-\Delta E$ (mV)	$\sigma-1/\sigma+1$	I_p (μA)
10	-0.193	-0.079
20	-0.371	-0.169
30	-0.526	-0.299
40	-0.653	-0.444
50	-0.751	-0.602
60	-0.825	-0.795
70	-0.878	-1.018
80	-0.916	-1.243
90	-0.942	-1.473
100	-0.961	-1.607
110	-0.973	-1.819
120	-0.982	-2.074
130	-0.988	-2.236
140	-0.992	-2.337
150	-0.994	-2.453
170	-0.997	-2.615
200	-0.999	-2.713
250	-0.9998	-2.782
300	-0.99998	-2.837

En la figura 4.12.2.4 se ha representado la intensidad de pico en función de $\sigma-1/\sigma+1$, donde se observa un crecimiento en la intensidad de pico a medida que aumentan los valores de $\sigma-1/\sigma+1$. Este aumento, sin embargo, no es lineal lo que, en consecuencia, ratifica el proceso irreversible.

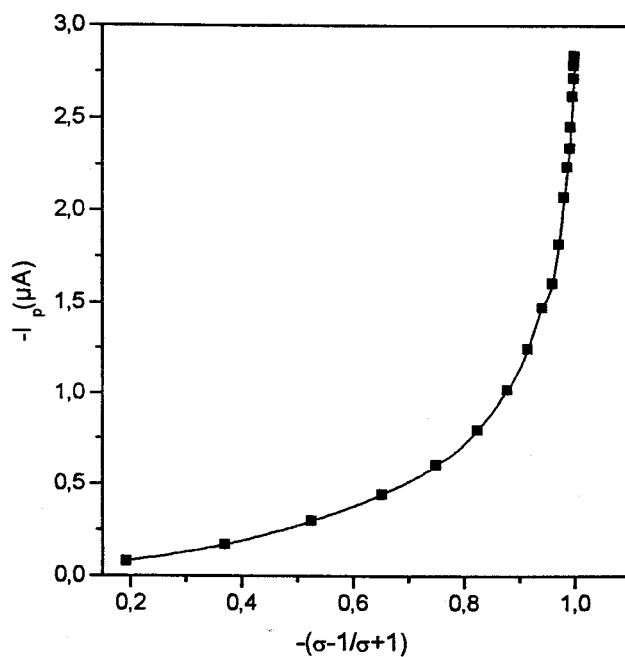


Figura 4.12.2.4.
Estudio de la reversibilidad por PPD. Relación entre I_p y $\sigma-1/\sigma+1$ (para $n=2$).

4.12.3 ESTUDIO DE LA REVERSIBILIDAD MEDIANTE VOLTAMETRÍA CÍCLICA.

Se estudió la evolución del potencial y la intensidad de pico en los voltamperogramas obtenidos a distintas velocidades de barrido entre 10 y 1200 mV/s en muestras que contenían prilocaína en una concentración de 10^{-4} M a pH 3.5.

En la tabla 4.12.3.1 se muestran los valores obtenidos, en los que se observa un aumento de la intensidad de pico al aumentar la velocidad de barrido excepto para valores muy altos de velocidad de barrido, entre 1000 y 1200 mV/s donde disminuye considerablemente.

Tabla 4.12.3.1.
Estudio de la reversibilidad mediante VC. Variación de la intensidad de pico con la velocidad de barrido.

V_b (mV/s)	$V_b^{1/2}$	$I_p(\mu A)$
10	3.16	-0.002
20	4.47	-0.113
30	5.48	-0.225
40	6.32	-0.326
50	7.07	-0.428
60	7.75	-0.528
70	8.37	-0.587
80	8.94	-0.643
90	9.49	-0.701
100	10.00	-0.757
200	14.14	-1.246
300	17.32	-1.721
400	20.00	-2.080
500	22.36	-2.399
600	24.49	-2.832
700	26.46	-3.189
800	28.28	-3.389
900	30.00	-3.568
1000	31.62	-1.410
1100	33.17	-1.514
1200	34.64	-1.556

La dependencia lineal entre ambas magnitudes viene dada por la siguiente ecuación:

$$-I_p = -0.5525 + 0.1365 V_b^{1/2}; r=0.9981.$$

ratificando que el proceso responsable de dicha onda está controlado por difusión de la sustancia electroactiva hacia el electrodo de trabajo.

Así mismo se confirma la irreversibilidad del proceso redox mediante la técnica VC ya que se obtiene únicamente señal de reducción, sin aparecer en el barrido anódico la señal de oxidación correspondiente, como puede observarse en la figura 4.12.3.2.

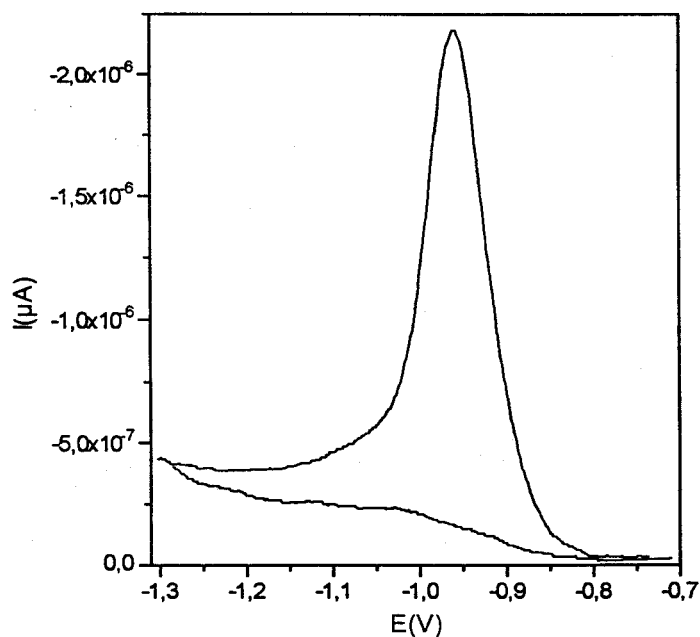


Figura 4.12.3.2.
Ciclovoltamperograma obtenido para la N-nitrosamina derivada de la prilocaína a pH 3.5.

En la tabla 4.12.3.2 se muestran los valores de $n_a\alpha$, calculados a partir de la diferencia entre los potenciales de pico y de onda media. Se observa que a medida que aumenta la velocidad de barrido el potencial de pico se va desplazando hacia valores más negativos, comportamiento que corrobora la irreversibilidad del proceso de reducción.

Tabla 4.12.3.2.
Estudio de la reversibilidad por VC de la onda de reducción de la N-nitrosamina derivada de la prilocaína. Estimación del factor $n_a\alpha$.

V_b (mV/s)	E_p (V)	$E_{1/2}$ (V)	$n_a\alpha$
10	-0.932	-0.910	1.50
20	-0.942	-0.920	1.50
30	-0.952	-0.924	1.33
40	-0.957	-0.929	1.33
50	-0.963	-0.932	1.30
60	-0.968	-0.934	1.23
70	-0.968	-0.937	1.33
80	-0.973	-0.939	1.23
90	-0.973	-0.941	1.33
100	-0.978	0.967	1.23
200	-0.993	-0.955	1.20
300	-1.003	-0.960	1.14
400	-1.008	-0.965	1.17
500	-1.018	-0.970	1.02
600	-1.023	-0.974	1.02
700	-1.028	-0.978	1.00
800	-1.028	-0.980	1.04
900	-1.033	-0.984	1.20
1000	-1.023	-0.978	1.07
1100	-1.028	-0.980	1.00
1200	-1.033	-0.984	0.94

$n_a\alpha$ media= 1.20 ± 0.16

4.13 DETERMINACIÓN DEL COEFICIENTE DE DIFUSIÓN Y DEL NÚMERO DE ELECTRONES.

Para el cálculo del valor del coeficiente de difusión se aplica la siguiente ecuación:

$$I_1 = 708nD^{1/2}Cm^{2/3}\tau^{1/6}$$

donde I_l se mide en A, n es el número de Faradays de electricidad por mol de reactivo, m es la velocidad del flujo de mercurio en kg/s, τ es el tiempo de gota controlado electrónicamente en segundos, C es la concentración del reactivo en mol/m³ y el número 708 es una combinación de varias constantes. El método consiste en representar la corriente de difusión en función de la concentración de la especie electroactiva, manteniendo constante los demás parámetros. A partir del valor obtenido para la pendiente de la recta, P , se calcula el valor del coeficiente de difusión, D , mediante la relación:

$$D = \left[\frac{P}{(708nm^{2/3}\tau^{1/6})} \right]^2$$

donde $m=4.55 \times 10^{-7}$ kg/s y $\tau=1$ s.

En la tabla 4.13.1 se exponen los valores de intensidad límite correspondiente a la onda de reducción de la N-nitrosamina derivada de la prilocaína a distintas concentraciones. Todas las muestras poseían un valor de pH de 3.5. En la figura 4.13.1 se representan estos valores observándose que existe una dependencia lineal entre la intensidad límite y la concentración de la especie electroactiva, cuya ecuación viene dada por:

$$-I_l = -2.447 \times 10^{-9} + 2.716 \times 10^{-6} C \quad r=0.9998$$

Tabla 4.13.1.
Determinación del coeficiente de difusión. Valores de intensidad límite y concentración de la N-nitrosamina derivada de la prilocaína.

$C(\text{mol/m}^3)$	$I_l(\text{A})$
0.004	-1.1×10^{-8}
0.006	-1.4×10^{-8}
0.010	-2.3×10^{-8}
0.040	-10.4×10^{-8}
0.080	-21.6×10^{-8}

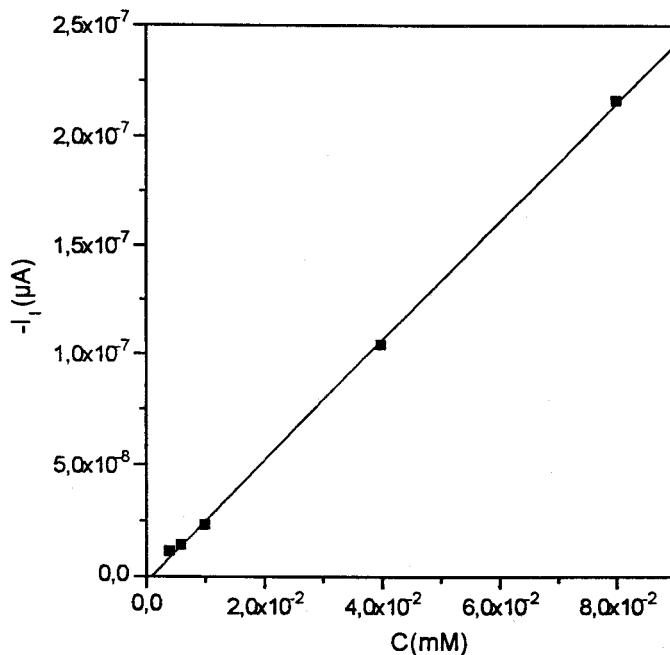


Figura 4.13.1.

Cálculo del coeficiente de difusión a través de la pendiente obtenida de la representación de la intensidad límite con respecto a la concentración de la especie electroactiva.

Sustituyendo el valor de la pendiente de la recta en la expresión anterior se obtiene un valor de coeficiente de difusión de $1.05 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$.

Una vez conocidos los potenciales iniciales y finales de la onda de reducción mediante polarografía tast y el coeficiente de difusión, se realiza una cronoculombimetría para cada una de las concentraciones utilizadas en el cálculo del coeficiente de difusión aplicando estos potenciales. Se representan los valores de Q frente a $t^{1/2}$ y la pendiente de la gráfica coincide con la expresión $2nFAD_o^{1/2}C_o^* / \pi^{1/2}$. Sustituyendo en esta ecuación y despejando n se calcula el número de electrones que intervienen en el proceso de reducción. En la tabla 4.13.2 se encuentran los valores de la pendiente obtenida al representar los valores de Q frente a $t^{1/2}$ para cada una de las concentraciones de N-nitrosamina derivada de la prilocaína estudiadas, así como, el número de electrones calculados.

Tabla 4.13.2.
Cálculo del número de electrones

C(M)	Pendiente (C/s ^{1/2})	nº de electrones
4×10 ⁻⁶	9.62×10 ⁻⁹	2.10
6×10 ⁻⁶	1.37×10 ⁻⁸	1.99
1×10 ⁻⁵	2.29×10 ⁻⁸	2.00
4×10 ⁻⁵	9.62×10 ⁻⁸	2.10
6×10 ⁻⁵	1.80×10 ⁻⁷	1.96
nº de electrones medio=		2.03 ± 0.06

Igualmente se calcularon el número de electrones a otros valores de pH 4.5 y 6.0. En la tabla 4.13.3 se muestran los valores de las pendientes obtenidas de la representación de Q frente a t^{1/2} y los valores del número de electrones correspondientes a cada valor de pH.

Tabla 4.13.3.
Cálculo del número de electrones a valores de pH 4.5 y 6.0.

pH	Pendiente (C/s ^{1/2})	nº de electrones
4.5	2.22×10 ⁻⁷	1.94
6.0	2.37×10 ⁻⁷	2.07

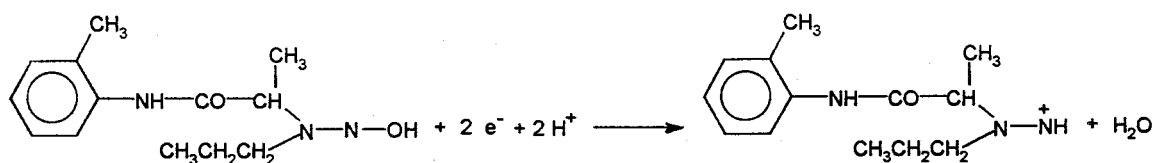
En todos los casos estudiados el número de electrones que intervienen en el proceso de reducción de la N-nitrosamina derivada de la prilocaína es 2.

4.14 MECANISMO DE REDUCCIÓN DE LA N-NITROSAMINA DERIVADA DE LA PRILOCAÍNA.

Como ya se ha visto en el apartado anterior el número de electrones que participan en el proceso de reducción de la especie electroactiva es 2 para los valores de pH de 3.5, 4.5 y 6.0.

En el rango de pH comprendido entre 1.5 y 6.0 el valor de $n_a\alpha$ es igual a 1.16 ± 0.05 . Utilizando la expresión $\Delta E_{1/2} / \Delta \text{pH} = 0.059 p / n_a\alpha$, se obtiene un valor de p (nº de protones) de 3.8 que podría aproximarse a 2.

Estos resultados están de acuerdo con el mecanismo global propuesto para similares compuestos (262). Por lo que, para la reducción de la N-nitrosamina derivada de la prilocaína, se propone el siguiente mecanismo:



4.15 INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN.

El estudio del comportamiento de la onda de reducción de la N-nitrosamina derivada de la prilocaína según la concentración a la que se encuentra en la muestra, conduce a conocer no sólo el rango lineal útil donde llevar a cabo las aplicaciones analíticas sino también para confirmar el carácter difusivo del proceso de reducción, que tiene lugar en la gota de mercurio del electrodo de trabajo, previamente predicho mediante otros criterios ya mencionados.

El intervalo de concentraciones estudiado ha sido desde 10^{-6} a 10^{-3} M, preparando muestras a estas concentraciones siguiendo el método ya descrito. El pH de todas las muestras fue de 3.5.

En la tabla 4.15.1 se muestran los valores de intensidad de pico correspondientes a las concentraciones arriba mencionadas. En la figura 4.15.1 se representa la intensidad de pico en función de la concentración únicamente para aquellos valores donde la dependencia entre las magnitudes representadas es lineal.

Tabla 4.15.1.
Influencia de la concentración para la onda de reducción de la N-nitrosamina derivada de la prilocaína.

C (M)	I_p (μA)
1×10^{-6}	-0.006
4×10^{-6}	-0.032
6×10^{-6}	-0.047
1×10^{-5}	-0.077
4×10^{-5}	-0.256
8×10^{-5}	-0.491
1×10^{-4}	-0.592
4×10^{-4}	-1.524
6×10^{-4}	-2.061
8×10^{-4}	-2.583
1×10^{-3}	-3.010

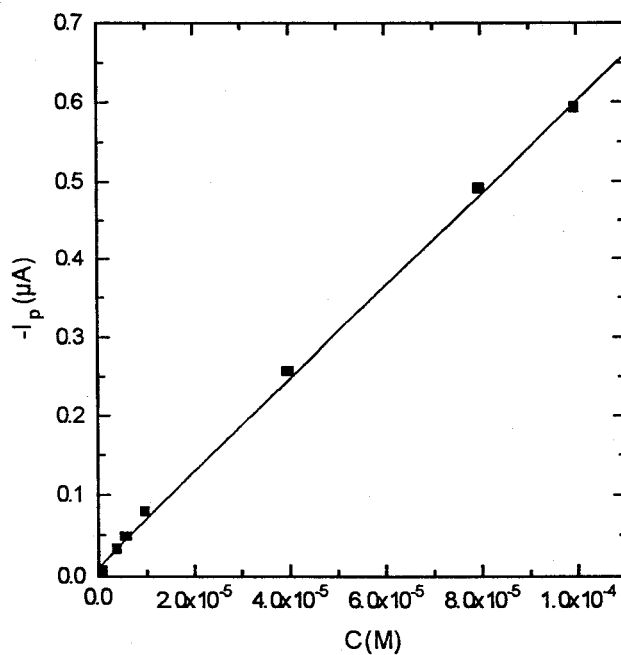


Figura 4.15.1.
Representación de la intensidad de pico en función de la concentración de la prilocaína.

La dependencia lineal que se observa en la anterior figura se recoge en la siguiente ecuación que muestra la pendiente y la ordenada en el origen de la correspondiente recta.

$$-I_p = 0.011 + 5907.14C ; r=0.9994.$$

Dada la existencia de una dependencia lineal entre ambas magnitudes se puede, por tanto, confirmar que el proceso responsable de la reducción de la N-nitrosamina derivada de la prilocaína está controlado fundamentalmente por fenómenos de difusión en la gota de mercurio del electrodo de trabajo.

4.16 PROCEDIMIENTO RECOMENDADO EN LA DETERMINACIÓN DE PRILOCAÍNA.

Se toman de 6.42 a 642 μg de una solución metanólica de prilocaína y se añaden 0.5 ml de metanol, 2 ml de nitrito sódico 3M y 6 ml de ácido fosfórico 2M. La adición de ácido fosfórico se realiza empleando una bureta de 10 ml y utilizando una velocidad de de adición aproximada de 0.01 ml/s y agitando vigorosamente. Una vez completada la adición de ácido fosfórico, se pasa nitrógeno a la solución durante 3 min.; después de lo cual se añade 2 ml de hidróxido sódico 2.5 M para obtener un pH de 3.5. Una vez realizado esto se añade agua Milli-Q hasta completar un volumen de 25 ml.

Para llevar a cabo las medidas de las muestras preparadas bajo este procedimiento se fijan las siguientes condiciones operacionales. Se utiliza como potencial inicial -0.5 V, la amplitud de pulso es de -50 mV, la velocidad de barrido empleada es de 5.1 mV/s. El rango de corriente es de 1 a 10 μA . El tiempo de goteo de 1 s y el tiempo de purga de 10 min.

4.17 REPRODUCIBILIDAD Y SEGURIDAD DEL MÉTODO.

Con el fin de determinar la reproducibilidad del método propuesto se prepararon 9 muestras iguales de clorhidrato de prilocaína 10^{-4} M y pH 3.5, siguiendo el método expuesto anteriormente para la preparación de muestras.

A continuación se registraron los polarogramas correspondientes obteniéndose los valores de intensidad de pico pertenecientes a la onda de reducción del producto de nitrosación de la prilocaína y se calculan los parámetros estadísticos (\bar{y} (I_p , μA); s ; s_m y % E) que se recogen en la tabla 4.17.1.

$$\bar{y} = \sum_{i=1}^n y_i \quad s = \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}{n} \quad s_m = \frac{s}{\sqrt{n}} \quad \%E = \frac{s_m}{\bar{y}} \times 100$$

Tabla 4.17.1.
Reproducibilidad y seguridad del método. Cálculo de parámetros estadísticos.

\bar{y} (I_p , μA)	-0.5968
	0.0058
s_m	0.0019
%E	0.32

4.18 ESTUDIO DE LOS LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN.

Se realizaron medidas por PPD para 9 muestras cuyas señales resultaron estar comprendidas entre 1 y 30 veces la señal de blanco, efectuando ocho replicados de cada medida (259). En la tabla 4.18.1 se encuentran los valores de intensidad de pico medios para la primera onda de reducción de la prilocaína, en la figura 4.18.1 se han representado dichos valores y en la tabla 4.18.2 se encuentran los resultados de la calibración junto con los límites de detección y cuantificación.

Tabla 4.18.1.
Cálculo del límite de detección y cuantificación. Valores de intensidad de pico obtenidos de la medida de ocho replicados de cada concentración.

C(M)	$I_p(\mu\text{A})$ medio
1×10^{-6}	0.0076
2×10^{-6}	0.0260
4×10^{-6}	0.0370
6×10^{-6}	0.0480
1×10^{-5}	0.0715
2×10^{-5}	0.1306
4×10^{-5}	0.2478
8×10^{-5}	0.4829
1×10^{-4}	0.6000

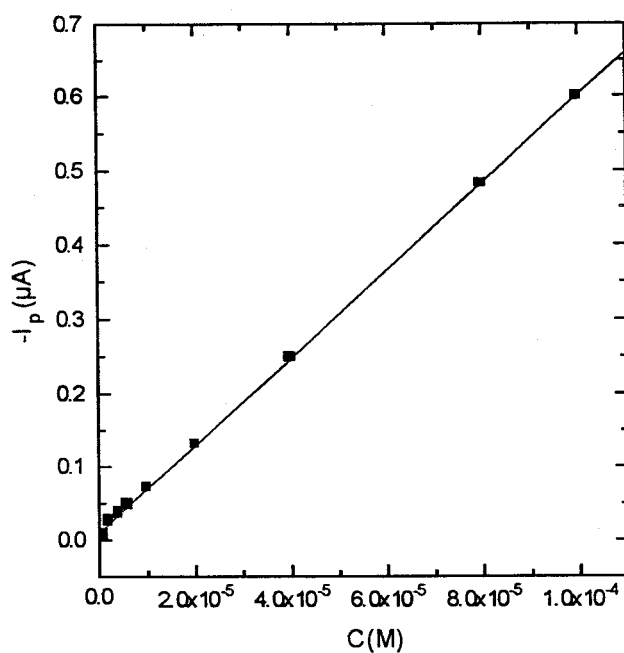


Figura 4.18.1.
Calibración de la determinación de prilocaína (cada punto es el promedio de 8 replicados)

Tabla 4.18.2.
Límites de detección y cuantificación, y parámetros de regresión para la determinación de la prilocaína por PPD.

q ₀	0.011
q ₁	5910.1
r	0.9994
LOD	6.2×10 ⁻⁷ M
LOQ	1.9×10 ⁻⁶ M

4.19 ESTUDIO DE INTERFERENCIAS.

Para llevar a cabo este estudio se prepararon muestras tal y como se describe en el apartado 4.16, que contenían 2.57 µg/ml de prilocaína y cantidades variables de especie extraña a ensayar, añadida antes de llevar a cabo la nitrosación. Todas las muestras poseían un pH de 3.5. En la tabla 4.19.1 se encuentran los resultados obtenidos, tomando como criterio de que existen interferencias cuando el porcentaje de error encontrado es superior al 5 %

Tabla 4.19.1.
Estudio de interferencias en la determinación de prilocaína.

Relación especie extraña/prilocaína	Especies extrañas
1000	Ácido cloroacético, ácido succínico, ácido amidosulfónico, alcohol n-amílico, creatina monohidrato, 1,4-dioxano, glioxal, tiourea, urea.
100	Ácido iminodiacético, sal sódica del ácido 2-nafatalenosulfónico, ácido salicílico, 2-aminopiridina, anhídrido ftálico.
50	Alcohol bencílico, dimedona, 4-metoxibenzaldehido, procaína.
≤10	2-aminofenol, dibucaína, lidocaína, ácido 2-tiobarbitúrico, tetracaína.

Son pocas las especies extrañas que interfieren en relación 1:10 en el método propuesto para la determinación de la prilocaína, aunque las que interfieren son en su mayoría otros anestésicos locales, que poseen en su molécula un nitrógeno amínico.

Por esta razón, pueden producir un compuesto nitrosado de estructura similar a la N-nitrosamina derivada de la prilocaína.

4.20 APLICACIONES.

Se determinó prilocaína en muestras sintéticas, donde cada una de ellas contenían diferentes especies orgánicas de las consideradas en el estudio de las interferencias. La elaboración de estas muestras sintéticas se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito.

La composición de estas muestras fue la siguiente:

* Muestra 1: 10^{-5} M en clorhidrato de prilocaína, y 10^{-2} M en urea, ácido cloroacético, ácido amidosulfónico.

* Muestra 2: 10^{-5} M en clorhidrato de prilocaína, y 10^{-2} M en urea, creatina y tiourea.

* Muestra 3: 10^{-5} M en clorhidrato de prilocaína, y 10^{-2} M en ácido succínico, 10^{-3} M de ácido salicílico y anhídrido ftálico.

* Muestra 4: 10^{-5} M en clorhidrato de prilocaína, y 10^{-2} M en alcohol n-amílico y glioxal, 10^{-3} M en alcohol bencílico.

En la tabla 4.20.1 se exponen la concentración de prilocaína obtenida en cada una de las muestras estudiadas.

Tabla 4.20.1.
Determinación de 10^{-5} M de prilocaína en varias muestras sintéticas.

Muestra	Concentración	Concentración	Recuperación
1	1×10^{-5}	0.99×10^{-5}	99
2	1×10^{-5}	1.02×10^{-5}	102
3	1×10^{-5}	1.02×10^{-5}	102
4	1×10^{-5}	0.99×10^{-5}	99

Tal y como se observa en la tabla las recuperaciones están muy próximas al 100%.

Se ha aplicado el método propuesto para la determinación del prilocaína en una preparación farmacéutica comercializada en España y se han comparado los resultados obtenidos frente a los obtenidos con el método de HPLC propuesto por la farmacopea estadounidense (263).

La composición de esta preparación farmacéutica, Citanest 2 %, es de 200 mg de clorhidrato de prilocaína, 90 mg de cloruro sódico y el resto hasta completar 10 ml de agua.

Se tomaron 62.4 μg de prilocaína para la preparación de las muestras que iban a ser determinadas tanto por PPD como por HPLC. La determinación siguiendo el método utilizado por la farmacopea estadounidense fue llevada a cabo mediante la lectura de la medida en altura de pico. En la tabla 4.20.2 se muestran los μg de prilocaína presentes en la formulación, así como los encontrados mediante ambas técnicas, habiéndose realizado tres replicados en cada método.

Tabla 4.20.2.
Determinación de prilocaína en un fármaco (μg de clorhidrato de prilocaína).

μg de clorhidrato de prilocaína según formulación	HPLC	Método propuesto
62.4	62.43 ± 0.60	62.29 ± 0.78

En la comparación de ambos métodos se siguió el t-test Student, obteniéndose un valor para $t = 0.25$, mientras que el valor tabulado a un nivel significativo de 0.05, fue de 2.78. De acuerdo con la hipótesis nula, ambos métodos dan los mismos resultados.

5. ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO POLAROGRAFICO DEL PRODUCTO DE OXIDACIÓN DE LA LIDOCAÍNA EN AGUA OXIGENADA. DETERMINACIÓN DE LIDOCAÍNA POR POLAROGRAFÍA DIFERENCIAL DE PULSO.

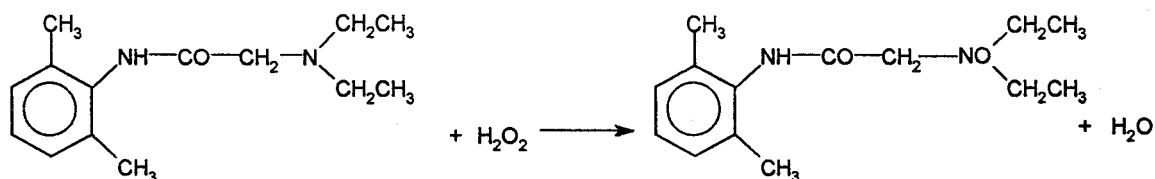
La lidocaína (dietilamino-2,6-dimetilacetanilida) posee un comportamiento polarográfico diferente de la dibucaína, pues éste último se reduce directamente en el electrodo de gotas de mercurio, mientras que el primero requiere una oxidación previa antes de la determinación polarográfica debido a que se encuentra en forma reducida.

Por este motivo, el primer paso seguido fue la búsqueda de un oxidante adecuado para la oxidación de este compuesto. Los oxidantes ensayados fueron: KIO_4 , Br_2 , Na_2O_2 , KMnO_4 , $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ y H_2O_2 . Los mejores resultados se obtuvieron con peróxido de hidrógeno, siguiendo el procedimiento descrito por H. Hoffmann (203) que se expone a continuación.

Se toman de 2 a 20 mg de lidocaína y se añaden de 1 a 3 ml de peróxido de hidrógeno, 1 a 3 ml de metanol y 0.2 ml de hidróxido potásico 1 M. Se calienta durante 5 a 15 min. a una temperatura de 40 a 80 °C dependiendo de la amina. Por último se diluye con 50 ml de agua y se añaden 0.2 ml de ácido fosfórico 0.67 M y 0.1 ml de catalasa con el fin de eliminar el exceso de peróxido y se espera durante 5 min. A continuación se añaden 20 ml de tampón acético/acetato 0.2 M de pH 4.7. La disolución se lleva a 100 ml con agua Milli-Q.

Una vez preparada la muestra, ésta se trasvasa a la celda polarográfica, donde se le hace pasar nitrógeno durante 10 min., tras los cuales se registran los polarogramas correspondientes mediante PPD barriendo desde 0 a -0.9 V y utilizando 1 s como tiempo de goteo y -50 mV como amplitud de pulso. Según estas condiciones aparece una onda a un potencial de -0.5 V, aproximadamente.

El peróxido de hidrógeno oxida a la lidocaína dando lugar al aminoóxido correspondiente según la reacción:



Después de unas experiencias previas, se optó por hacer algunas modificaciones al procedimiento de H. Hoffmann (203). Por un lado se sustituyó el tampón acético/acetato por el sistema fosfórico/NaOH, dado que con éste último se abarca un mayor rango de pH y por otro lado, se disminuyeron las cantidades empleadas para cada reactivo, reduciendo el volumen de la muestra a 25 ml. En la figura 5 se encuentra representado el polarograma obtenido mediante PPD de una muestra preparada de acuerdo con las modificaciones realizadas y según el siguiente procedimiento:

Se toman 2.5 ml de lidocaína 10^{-3} M y se añaden 0.5 ml de peróxido de hidrógeno, 50 μ l de hidróxido de potasio 1 M y 0.25 ml de metanol. Se calienta la mezcla durante 10 min. a 60 °C. Después se añaden 12.5 ml de agua Milli-Q, 50 μ l de ácido fosfórico 0.67 M y 25 μ l de catalasa y se espera durante 5 min. A continuación se añaden 5 ml de tampón fosfato 0.2 M de pH deseado y se añade agua Milli-Q hasta completar un volumen de 25 ml. La concentración final del aminoóxido producto de la oxidación de la lidocaína es de 10^{-4} M. La muestra así obtenida se trasvasa a la celda polarográfica donde se le pasa nitrógeno durante 10 min., registrándose a continuación los polarogramas con un tiempo de goteo de 1 s y una amplitud de pulso de -50 mV. En los polarogramas obtenidos, siguiendo este último procedimiento, se observa un incremento de la altura del pico cuando se emplea el sistema ácido fosfórico/NaOH.

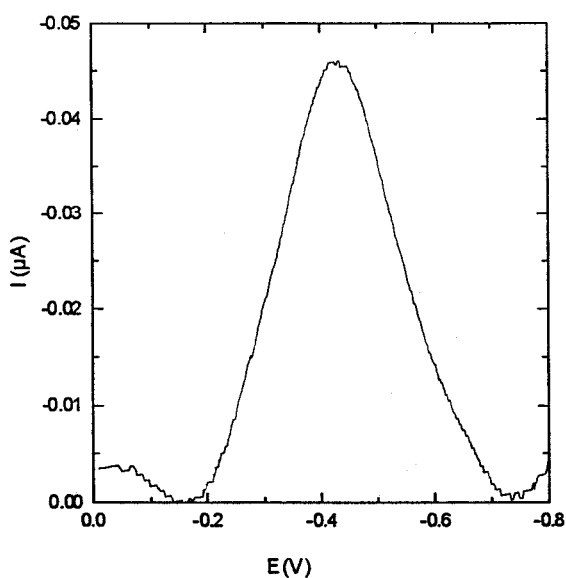


Figura 5.
Polarograma PPD correspondiente a la onda de reducción de la lidocaína previamente oxidada. Lidocaína 10^{-4} M, pH 2.8.

5.1. INFLUENCIA DE LA CANTIDAD DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO AÑADIDO EN LA REACCIÓN DE OXIDACIÓN.

Para realizar este estudio las muestras fueron preparadas siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente, variando la cantidad de peróxido de hidrógeno utilizado en la etapa de oxidación entre 0.05 a 4 ml y utilizando una cantidad de catalasa de 10 μ l. La concentración en todas las muestras del producto de oxidación de la lidocaína es de 10^{-4} M. El pH de la disolución resultante en cada caso es de 2.8. Las muestras fueron trasvasadas a la celda polarográfica, donde se pasó nitrógeno durante 10 min, y se registraron los polarogramas mediante PPD correspondientes, con 1 s de tiempo de goteo y -50 mV de amplitud de pulso.

En la tabla 5.1.1 se recogen los valores obtenidos de intensidad de pico y las cantidades correspondientes de peróxido de hidrógeno utilizado. La representación de estos datos se muestra en la figura 5.1.1. Se observa un aumento paulatino de la intensidad de pico a medida que aumenta la cantidad de peróxido de hidrógeno añadido hasta llegar a un valor de 2 ml de peróxido de hidrógeno, a partir del cual la intensidad de pico comienza a disminuir, debido a que la concentración de catalasa se encuentra por defecto con respecto a la de peróxido de hidrógeno.

Tabla 5.1.1.
Valores de intensidad de pico correspondientes a las variaciones de la cantidad de peróxido de hidrógeno añadido en la etapa de oxidación de la lidocaína.

μ l de H_2O_2 añadido	I_p (μ A)
0.050	-0.036
0.075	-0.041
0.100	-0.048
0.150	-0.048
0.200	-0.048
0.250	-0.050
0.500	-0.052
1.000	-0.058
1.500	-0.060
2.000	-0.060
2.500	-0.058
3.000	-0.057
3.500	-0.051
4.000	-0.049

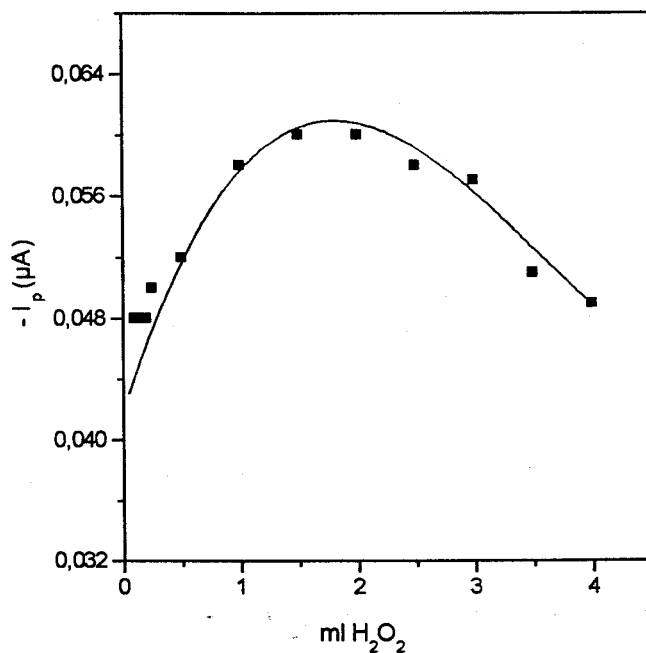


Figura 5.1.1.

Variación de la intensidad de pico con respecto a la cantidad de peróxido de hidrógeno de la onda de reducción del producto de oxidación de la lidocaína.

Para confirmar lo expuesto anteriormente sobre la disminución de la intensidad de pico a partir de un valor determinado de cantidad de peróxido de hidrógeno, se procedió a comprobar el efecto producido al variar la cantidad de catalasa en muestras que contenían cantidades de peróxido de hidrógeno de 3.5 y 4.0 ml. Las cantidades de catalasa probadas fueron desde 10 a 25 μl .

En la tabla 5.1.2 se muestran los valores obtenidos de intensidad de pico para cada una de las cantidades de catalasa utilizadas. En esta tabla se muestra y confirma como al aumentar la cantidad de catalasa utilizada para eliminar el exceso de peróxido presente en la solución se obtienen valores de intensidad de pico prácticamente iguales y muy próximos al valor máximo de 0.060 μA que se alcanza con 2 ml de peróxido de hidrógeno.

Tabla 5.1.2.
Valores de intensidad de pico obtenidos al variar la cantidad de catalasa añadida en la etapa de eliminación del exceso de peróxido de hidrógeno.

μl Catalasa	ml H_2O_2	$I_p(\mu\text{A})$
10	3.5	-0.051
	4.0	-0.049
15	3.5	-0.062
	4.0	-0.057
20	3.5	-0.057
	4.0	-0.056
25	3.5	-0.055
	4.0	-0.057

Teniendo en cuenta estos resultados, se eligieron 2 ml de peróxido de hidrógeno y 10 μl de catalasa para realizar la experiencias exteriores.

5.2. INFLUENCIA DE LA CANTIDAD AÑADIDA DE HIDRÓXIDO POTÁSICO EN LA ETAPA DE OXIDACIÓN.

Las muestras fueron preparadas siguiendo el procedimiento ya descrito anteriormente, a las que se añadieron 2 ml de peróxido de hidrógeno en la etapa de oxidación, 10 μl de catalasa en la etapa de eliminación de éste y cantidades variables de hidróxido potásico desde 25 a 500 μl .

En la tabla 5.2.1 se muestran los valores obtenidos de intensidad de pico según la cantidad de hidróxido potásico añadido a cada muestra.

Tabla 5.2.1.
Influencia de la cantidad de hidróxido potásico añadido en la etapa de oxidación de la lidocaína.

μl de KOH	$I_p(\mu\text{A})$
25	-0.045
50	-0.062
100	-0.061
150	-0.060
200	-0.053
250	No se obtiene onda
500	No se obtiene onda

Se observa que para cantidades de hidróxido sódico muy grandes no se obtiene la correspondiente onda de reducción, por lo que se eligieron 50 ml de hidróxido potásico como cantidad óptima para la oxidación.

5.3. INFLUENCIA DEL pH.

El estudio del pH en el comportamiento polarográfico del producto de oxidación de la lidocaína se ha efectuado mediante polarografía diferencial de pulso. Para llevar a cabo este estudio se prepararon muestras en matraces de 25 ml que contenían solución tampón fosfato 1 M de pH comprendido entre 0.9 y 5.5, 2.5 ml de solución de lidocaína de concentración 10^{-3} M, que previamente se ha oxidado mediante H_2O_2 en medio básico siguiendo el procedimiento descrito anteriormente y eliminando posteriormente el H_2O_2 sobrante con catalasa en medio neutro y agua Milli-Q hasta completar los 25 ml.

Las disoluciones así preparadas que contienen lidocaína 10^{-4} M se trasvasan a la celda polarográfica, donde se desoxigenan durante 10 minutos al paso de una corriente de nitrógeno, registrándose seguidamente los polarogramas correspondientes entre 0 y -0.9 V, utilizando como tiempo de goteo 1 s y una amplitud de pulso de -50 mV. En la tabla 5.3.1 se muestra los valores obtenidos de potencial e intensidad de pico en la reducción polarográfica del producto de oxidación de la lidocaína y en las figuras 5.3.1 y 5.3.2 se muestra la variación existente entre el potencial e intensidad de pico, respectivamente, con el pH para la onda de reducción.

Tabla 5.3.1.
Influencia del pH en la reducción polarográfica del producto de oxidación de la lidocaína.

pH	$E_p(V)$	$I_p(\mu A)$
0.9	-0.49	-0.057
1.6	-0.49	-0.057
2.1	-0.50	-0.058
2.5	-0.50	-0.056
2.8	-0.50	-0.057
3.0	-0.50	-0.054
3.6	-0.51	-0.055
4.3	-0.57	-0.043
4.9	-0.63	-0.047
5.3	-0.64	-0.033

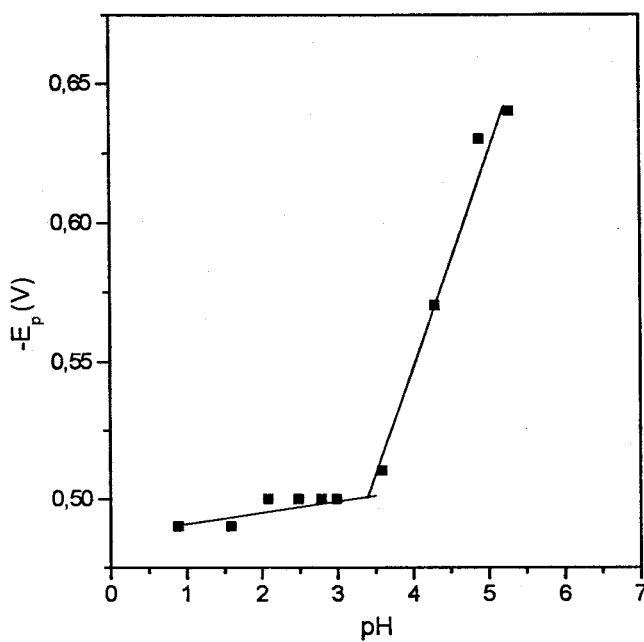


Figura 5.3.1.
Variación del potencial de pico frente al pH correspondiente a la onda de reducción del producto de oxidación de la lidocaína.

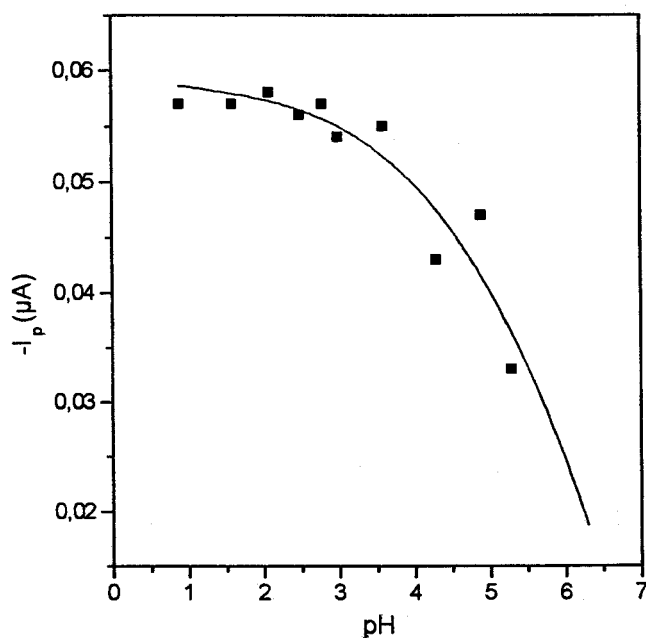
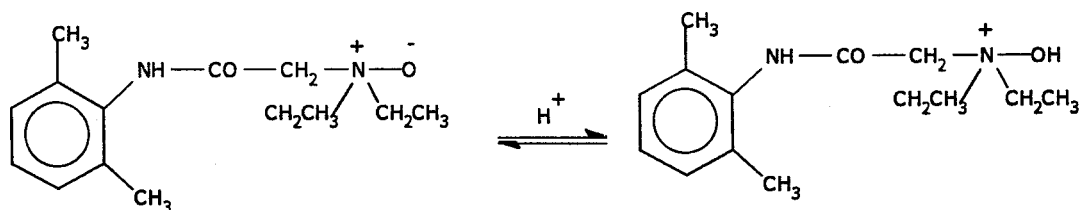


Figura 5.3.2.
Variación de la intensidad de pico con respecto al pH en la reducción del producto de oxidación de la lidocaína.

En la figura 5.3.1 se observan dos tramos rectilíneos, uno comprendido entre valores de pH 0.9 y 3.5 independiente del pH y otro entre los valores de 3.5 y 5.3 en el que existe una variación lineal hacia valores más negativos de potencial y con pendiente de -80 mV. Todo esto pone de manifiesto la intervención de los protones en el proceso electroquímico responsable de la onda de reducción a valores de pH entre 3.5 y 5.3, lo que podría indicar que ocurre una protonación en el nitrógeno correspondiente al aminoóxido formado en la oxidación de la lidocaína resultando un grupo hidroxilamino que es reducido posteriormente en el electrodo de mercurio.



Observando la variación de la I_p frente al pH se puede comprobar como ésta va disminuyendo progresivamente a medida que aumenta el pH. A pH superiores a 5.3 la onda correspondiente al producto de oxidación de la de lidocaína prácticamente desaparece. El valor elegido de pH para posteriores estudios es 2.8 por los criterios ya mencionados en el capítulo 2.

5.4. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DEL TAMPÓN FOSFATO.

Para llevar a cabo este estudio se prepararon muestras siguiendo el procedimiento descrito anteriormente pero variando la concentración de tampón fosfato de pH 2.8. Todas las muestras contenían una concentración de 10^{-4} M de la lidocaína.

Los resultados obtenidos para cada concentración de tampón se muestran en la tabla 5.4.1. Se observa que los valores de E_p e I_p se hacen constantes a partir de una concentración de tampón 0.5 M. En estudios posteriores se eligió una concentración 1 M de tampón fosfato.

Tabla 5.4.1.
Variación de la intensidad de pico y potencial de pico con la concentración del tampón fosfato.

$C_{\text{tampón}} \text{ (M)}$	$I_p \text{ (}\mu\text{A)}$	$E_p \text{ (V)}$
0.1	-0.047	-0.61
0.5	-0.064	-0.58
1.0	-0.064	-0.58
1.5	-0.066	-0.58
2.0	-0.065	-0.58

5.5. INFLUENCIA DEL TAMAÑO DE LA GOTA DE MERCURIO.

En las condiciones establecidas hasta ahora, se estudia la variación que se produce en la I_p y E_p al cambiar el tamaño de la gota de mercurio, en la reducción del producto de oxidación de la lidocaína, en muestras que tienen una concentración de 10^{-4} M en lidocaína a pH 2.8.

En la tabla 5.5.1 se encuentran los valores de intensidad y potencial de pico obtenidos. Tal y como era de esperar a medida que aumenta el tamaño de gota aumenta la intensidad de pico permaneciendo constante el potencial de pico.

Tabla 5.5.1.
Influencia del tamaño de gota de mercurio.

Tamaño _{gota} (mm ²)	I_p (μ A)	E_p (V)
0.25	-0.039	-0.56
0.40	-0.053	-0.56
0.52	-0.066	-0.56

En todas las experiencias realizadas en la reducción del producto de oxidación de la lidocaína, anteriores y posteriores a este estudio, se trabajó con tamaño de gota de 0.52 mm².

5.6. INFLUENCIA DEL TIEMPO DE GOTEO.

Dado que para la altura del depósito prefijada y para corrientes controladas por difusión:

$$A = Kt_g^{2/3}$$

donde A es el área de la gota y K engloba al valor numérico 0.85 y a la velocidad de flujo a la altura prefijada, si se mantiene constante la altura del depósito de mercurio y se registran los polarogramas correspondientes a los distintos tiempos de goteo que

permita el instrumental utilizado, se obtienen intensidades de pico que serán función del tiempo de goteo.

Se obtendrá, por tanto, la expresión:

$$I_p = f(t_g^{2/3})$$

e I_p aumentará conforme lo haga el tiempo de goteo y variará de forma lineal con $t_g^{2/3}$.

Se prepararon muestras de concentración de lidocaína 10^{-4} M a pH de 2.8 en las condiciones establecidas hasta ahora. Una vez registrados los polarogramas correspondientes a distintos tiempos de goteo, se construye la tabla 5.6.1 que muestra un aumento de la intensidad de pico a medida que aumenta el tiempo de goteo.

Tabla 5.6.1.
Influencia del tiempo de goteo para la onda de reducción del producto de oxidación de la lidocaína.

t_g (s)	$t_g^{2/3}$	I_p (μ A)
0.5	0.63	-0.039
0.7	0.79	-0.053
0.9	0.93	-0.061
1.0	1.00	-0.064
1.1	1.07	-0.066
1.3	1.19	-0.070
1.5	1.31	-0.073
1.7	1.42	-0.075
1.9	1.53	-0.076
2.0	1.59	-0.077

En la figura 5.6.1 se representa la intensidad de pico en función de $t_g^{2/3}$. Tal y como se observa en esta representación, la intensidad de pico aumenta con el tiempo de goteo, sin embargo, no se observa linealidad en todo el rango de tiempos de goteo estudiado; el tramo lineal entre la intensidad de pico y el tiempo de goteo se encuentra para valores comprendidos entre 0.9 y 1.5 s, cuya ecuación es:

$$-I_p = 0.0320 + 0.01966t_g^{2/3}$$

con un coeficiente de correlación de 0.993.

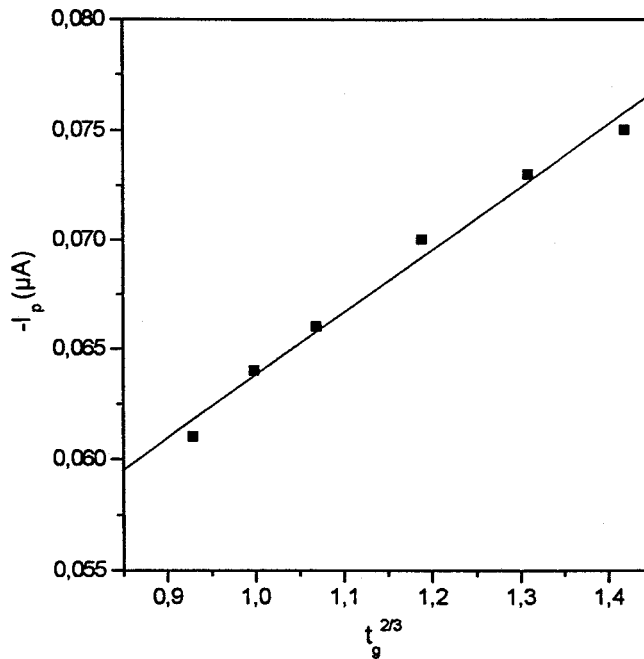


Figura 5.6.1.

Variación de la intensidad de pico en función de $t_g^{2/3}$ para la onda de reducción del producto de oxidación de la lidocaína.

Este comportamiento lineal entre tiempos de goteo de 0.9 y 1.5 s confirma el carácter difusivo de la onda de reducción del producto de oxidación de la lidocaína. El tiempo de goteo escogido para posteriores estudios es de 1 s.

5.7. INFLUENCIA DE LA AMPLITUD DE PULSO APLICADO.

Este estudio permite llevar a cabo la elección de una adecuada amplitud de pulso que proporcione una buena sensibilidad y resolución, factores que se encuentran íntimamente ligados.

Para ello se prepararon muestras de concentración 10^{-4} M en lidocaína y de pH 2.8, en las condiciones óptimas establecidas y se registraron los polarogramas correspondientes a valores de amplitud de pulso comprendidos entre -6 y -100 mV, fijando para ello las condiciones operacionales de 1 s como tiempo de goteo y 0.52 mm^2 como tamaño de gota.

De los polarogramas obtenidos en cada caso deducimos los valores de intensidad de pico que se muestran en la tabla 5.7.1 junto los correspondientes valores de amplitud de pulso aplicado.

Tabla 5.7.1.
Variación de la intensidad de pico con la amplitud de pulso de la reducción del producto de oxidación de la lidocaína.

$-\Delta E(\text{mV})$	$-I_p(\mu\text{A})$
6	-0.014
8	-0.015
10	-0.016
14	-0.019
18	-0.023
20	-0.025
24	-0.031
30	-0.041
34	-0.045
40	-0.049
44	-0.055
50	-0.062
54	-0.066
60	-0.073
64	-0.078
70	-0.086
80	-0.100
90	-0.115
100	-0.130

En la figura 5.7.1 se ha representado la variación de la intensidad de pico en función de la amplitud de pulso aplicado en la que se observa un aumento lineal de la I_p a medida que aumenta el valor de amplitud de pulso. La amplitud de pulso escogida para posteriores estudios es -50 mV.

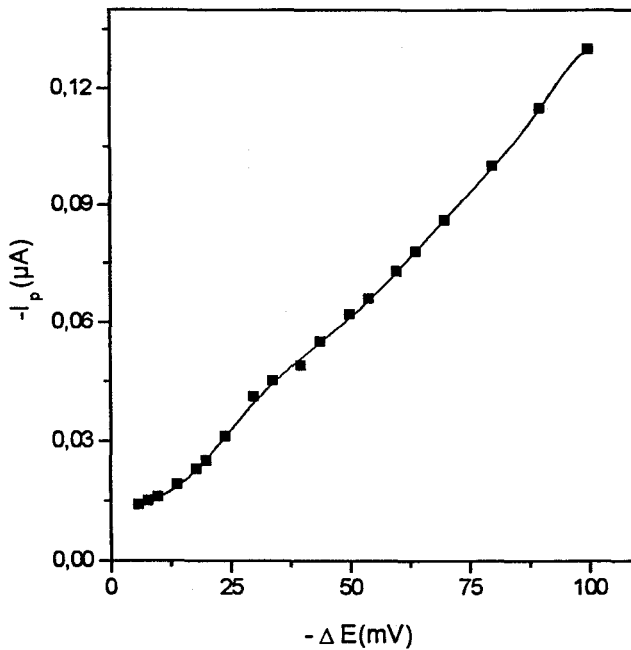


Figura 5.7.1.
Variación de la intensidad de pico con la amplitud de pulso aplicada para la onda de reducción del producto de oxidación de la lidocaína.

5.8. INFLUENCIA DE LA VELOCIDAD DE BARRIDO.

Se prepararon muestras similares a la de estudios anteriores y se registraron polarogramas mediante PPD variando en cada medida el valor de la velocidad de barrido y fijando el tiempo de goteo a 1 s., la amplitud de pulso a -50 mV y el tamaño de gota a 0.52 mm^2 .

Los valores de intensidad de pico en cada medida son recogidos en la tabla 5.8.1 que muestra como la variación en el valor de la velocidad de barrido no produce cambios en la intensidad de pico de la onda de reducción. Con lo cual, no se podría expresar ninguna predilección a la hora de elegir la velocidad de barrido más adecuada para la obtención de la onda de reducción de interés.

Tabla 5.8.1.

Valores de intensidad de pico correspondientes a la variación de la velocidad de barrido para la onda de reducción del producto de oxidación de la lidocaína.

V_b (V/s)	I_p (μ A)
0.0025	-0.063
0.0050	-0.063
0.0100	-0.062
0.0200	-0.063

5.9. INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA.

Este estudio permite conocer cual es la naturaleza de la corriente que controla el proceso de reducción de la especie objeto de estudio.

Para estudiar la influencia de la temperatura sobre la intensidad de pico de la onda de reducción del producto de oxidación de la lidocaína se prepararon muestras de concentración 10^{-4} M y de pH 2.8, en las condiciones ya establecidas y se registraron los plarogramas correspondientes después de calentar las muestras entre 25 y 60 °C.

En la tabla 5.9.1 se muestra los valores de intensidad de pico obtenidos a distintas temperaturas y en la figura 5.9.1 se ha representado el logaritmo de la intensidad de pico en función de la temperatura. El coeficiente de temperatura medio obtenido a partir de estos resultados es de $1.3 \text{ } ^\circ\text{C}^{-1} \%$, valor que indica que el proceso de reducción está controlado por difusión.

Tabla 5.9.1.

Inluencia de la temperatura en la onda de reducción.

T (°C)	Log I_p
25	-1.18
35	-1.15
40	-1.11
45	-1.08
50	-1.05
55	-1.03
60	-1.00

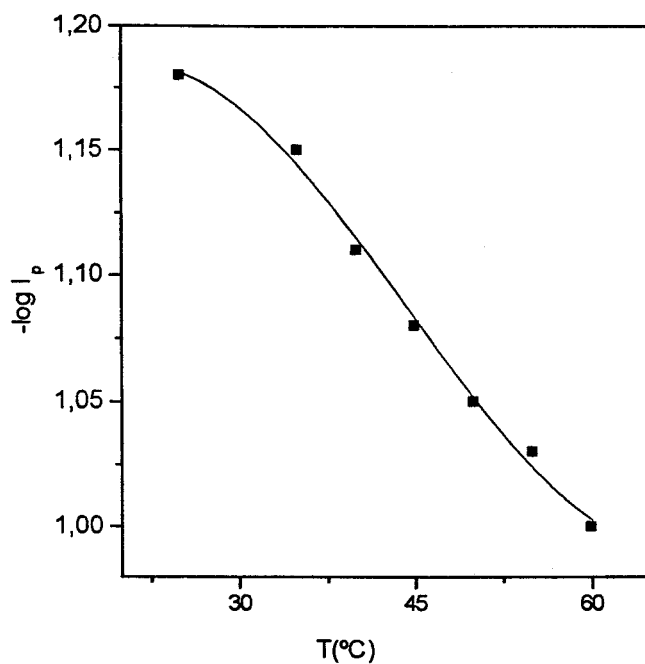


Figura 5.9.1.
Variación del logaritmo de la intensidad de pico con la temperatura.

5.10. ESTUDIO DE LA REVERSIBILIDAD.

Este estudio se ha llevado a cabo empleando las técnicas tast, PPD y VC.

5.10.1. ESTUDIO DE LA REVERSIBILIDAD DE LOS PROCESOS MEDIANTE TAST.

Los criterios utilizados son: análisis logarítmico de la función intensidad-potencial y determinación del valor $E_{3/4}-E_{1/4}$.

Se prepararon muestras conteniendo lidocaína 10^{-4} M en las condiciones óptimas fijadas anteriormente, a pH diferentes entre 0.9 y 4.9 y se analizó la variación del $\log I/I-I$ con el potencial aplicado, a cada valor de pH.

En la tabla 5.10.1.1 se recogen los valores de potencial de semionda, intensidad límite y de $n_a\alpha$ para cada valor de pH.

Tabla 5.10.1.1.
Estudio de la reversibilidad de la onda de reducción del producto de oxidación de la lidocaína.

pH	$E_{1/2}(V)$	$I_l(\mu A)$	$n_a\alpha$
0.9	-0.34	-0.043	0.60
1.6	-0.30	-0.041	0.55
2.1	-0.30	-0.042	0.58
2.8	-0.35	-0.038	0.56
3.0	-0.40	-0.034	0.63
3.6	-0.51	-0.039	0.61
4.3	-0.61	-0.027	0.54
4.9	-0.81	-0.031	0.50
$n_a\alpha_{medio} =$			$0.57 \pm 2 \cdot 10^{-3}$

Según este valor de $n_a\alpha_{medio}$ el proceso de reducción del producto de oxidación de la lidocaína sería irreversible cualquiera que sea el valor de n.

En la tabla 5.10.1.2 se muestran los valores de la diferencia entre los potenciales $E_{3/4}-E_{1/4}$ para cada pH y a partir de esta diferencia se deduce si el proceso de reducción es reversible o irreversible aplicando la siguiente regla:

$$|E_{3/4} - E_{1/4}| > \frac{0.059}{n}$$

Tabla 5.10.1.2.
Valores de $E_{3/4}-E_{1/4}$ para cada valor de pH.

pH	$E_{3/4} - E_{1/4}$
0.9	-0.08
1.6	-0.06
2.3	-0.07
2.8	-0.05
3.0	-0.07
3.6	-0.08
4.3	-0.09
4.9	-0.06

Aplicando la ecuación anterior y en el caso de que el número de electrones que participan en el proceso de reducción sea 2, se observa que para cualquier valor de pH la diferencia en $E_{3/4}-E_{1/4}$ es siempre mayor a $-0.059/n$ lo que indica que es un proceso irreversible.

5.10.2. ESTUDIO DE LA REVERSIBILIDAD DE LOS PROCESOS MEDIANTE PPD.

A) Criterio de R.L. Birke (6)

En la figura 5.10.2.1 se encuentran los polarogramas correspondientes al barrido anódico y catódico (utilizando amplitud de pulso de +50 mV para el barrido anódico y -50 mV para el barrido catódico) para una muestra de concentración 10^{-4} M de la lidocaína y de pH 2.8.

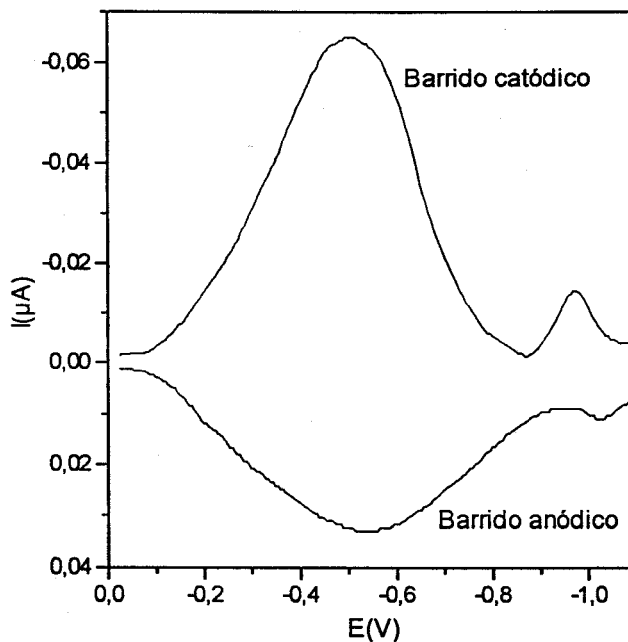


Figura 5.10.2.1.
Estudio de la reversibilidad. Criterio de Birke.

En la tabla 5.10.2.1 se muestran los valores de potencial e intensidad de pico correspondientes al barrido anódico y catódico.

Tabla 5.10.2.1.
Valores de potencial e intensidad de pico anódicos y catódicos.

Barrido anódico		Barrido catódico	
E_p^a (V)	I_p^a (μ A)	E_p^c (V)	I_p^c (μ A)
-0.55	0.034	-0.5	-0.066

Según el análisis de los potenciales e intensidades de pico correspondientes al barrido anódico y catódico se tiene que el cociente entre la intensidad de pico anódica y catódica, $|I_p^a / I_p^c|$, es 0.51, valor que es menor que 1, por lo que, el proceso es irreversible. La diferencia entre el potencial de pico catódico y anódico, $E_p^c - E_p^a$, es 50 mV, valor que muestra que el proceso es irreversible.

B) Determinación de la anchura de medio pico $W_{1/2}$ cuando $\Delta E=0$. (7)

Utilizando los polarogramas correspondientes al apartado 5.7 de este capítulo se obtienen las medidas de la anchura de medio pico para cada valor de amplitud de pulso medida. En la tabla 5.10.2.2 se encuentran estos valores y en la figura 5.10.2.2 se representan gráficamente en función de la amplitud de pulso aplicada. Extrapolando a $\Delta E=0$ se obtiene un valor de anchura de medio pico de 23.3, que se corresponde con un proceso irreversible.

Tabla 5.10.2.2.
Valores de anchura de medio pico correspondientes a cada amplitud de pulso aplicado.

$-\Delta E$ (mV)	$W_{1/2}$
6	36.5
8	32.5
10	32.5
14	34.0
18	34.5
20	35.5
24	34.5
30	35.0
34	35.5
40	35.0
44	35.0
50	34.0
54	35.0
60	34.5
64	34.5
70	34.0
80	35.0
90	35.0
100	34.0

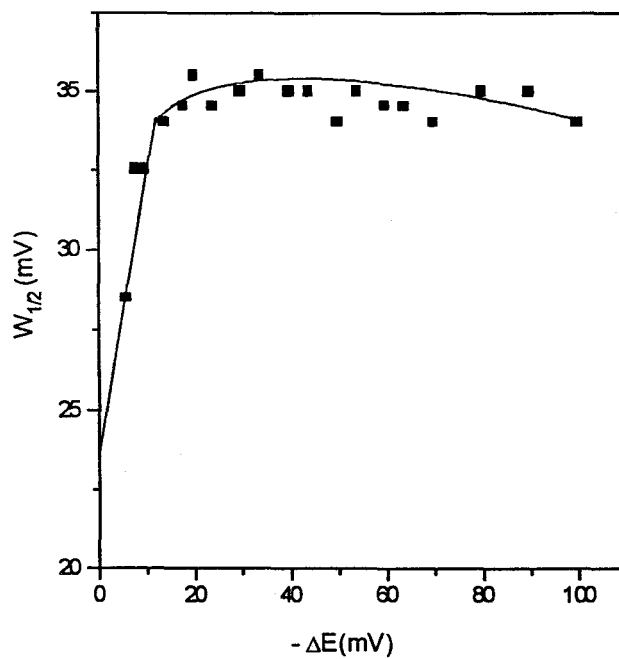


Figura 5.10.2.2.
Representación de la anchura de medio pico en función de la amplitud de pulso aplicado.

C) Variación de E_p con ΔE . (8)

Al igual que en el apartado anterior, para llevar a cabo este criterio se utilizan los polarogramas correspondientes al estudio realizado en el apartado 5.7 del presente capítulo.

En la tabla 5.10.2.3 se recogen los valores de potencial de pico correspondientes a cada valor de amplitud de pulso aplicado y en la figura 5.10.2.3 se muestra la representación del potencial de pico en función de la amplitud de pulso aplicada.

Tabla 5.10.2.3.
Variación del potencial de pico con la amplitud de pulso aplicada.

$E_p(V)$	$-\Delta E(mV)$
-487	6
-488	8
-490	10
-495	14
-500	18
-502	20
-506	24
-511	30
-517	34
-523	40
-527	44
-531	50
-538	54
-543	60
-546	64
-551	70
-561	80
-569	90
-578	100

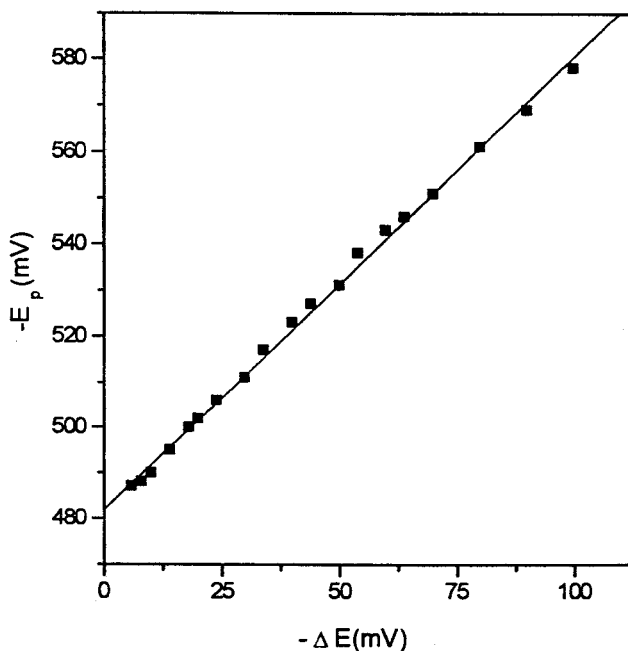


Figura 5.10.2.3.
Relación entre el potencial de pico y la amplitud de pulso aplicada.

A medida que aumenta la amplitud de pulso aplicada el potencial de pico se desplaza linealmente hacia valores más negativos de potencial, poseyendo esta dependencia lineal una pendiente mayor que el valor de 0.5, típico para procesos reversibles. La dependencia lineal entre ambas magnitudes viene expresada por la siguiente ecuación, siendo el coeficiente de correlación de 0.9987,

$$-E_p = 482.0 + 0.99\Delta E$$

Este valor tan alto de pendiente nos indica que el proceso de reducción es irreversible.

D) Relación entre I_p y $\sigma^{-1}/\sigma+1$. (8)

Mediante este estudio se puede confirmar la reversibilidad o irreversibilidad de un proceso a través de la representación de I_p en función de $\sigma^{-1}/\sigma+1$. En el caso que la representación obtenida sea lineal se concluye que el proceso que tiene lugar en el

electrodo de gotas de mercurio es un proceso reversible e irreversible en caso contrario.

A partir de los datos ΔE mostrados en el apartado 5.7 del presente capítulo se deduce el valor de $\sigma^{-1}/\sigma+1$ para cada valor de intensidad de pico. La deducción de este valor conociendo n y ΔE se realiza a través de la siguiente expresión:

$$\sigma = e^{\frac{nF \Delta E}{RT}} - 1$$

Considerando a n como 2 (siendo n el número de electrones intercambiados en el proceso de reducción de la especie electroactiva) se obtienen los siguientes valores de σ , y por consiguiente de $\sigma^{-1}/\sigma+1$ que son mostrados en la tabla 5.10.2.4 junto con los correspondientes valores de I_p y ΔE .

Tabla 5.10.2.4.
Estudio de la reversibilidad. Relación entre I_p y $\sigma^{-1}/\sigma+1$.

$-\Delta E(\text{mV})$	$\sigma^{-1}/\sigma+1$	$I_p(\mu\text{A})$
6	-0.117	-0.014
8	-0.155	-0.015
10	-0.193	-0.016
14	-0.267	-0.019
18	-0.337	-0.023
20	-0.372	-0.025
24	-0.437	-0.031
30	-0.527	-0.041
34	-0.580	-0.045
40	-0.653	-0.049
44	-0.695	-0.055
50	-0.751	-0.062
54	-0.783	-0.066
60	-0.825	-0.073
64	-0.848	-0.078
70	-0.878	-0.086
80	-0.916	-0.100
90	-0.942	-0.115
100	-0.961	-0.130

En la figura 5.10.2.4 se ha representado la intensidad de pico en función de $\sigma-1/\sigma+1$ donde se observa un crecimiento en la intensidad de pico a medida que aumentan los valores de $\sigma-1/\sigma+1$. Este aumento, sin embargo, no es lineal lo que, en consecuencia, pone de manifiesto que el proceso responsable de la reducción del producto de oxidación de la lidocaína es irreversible.

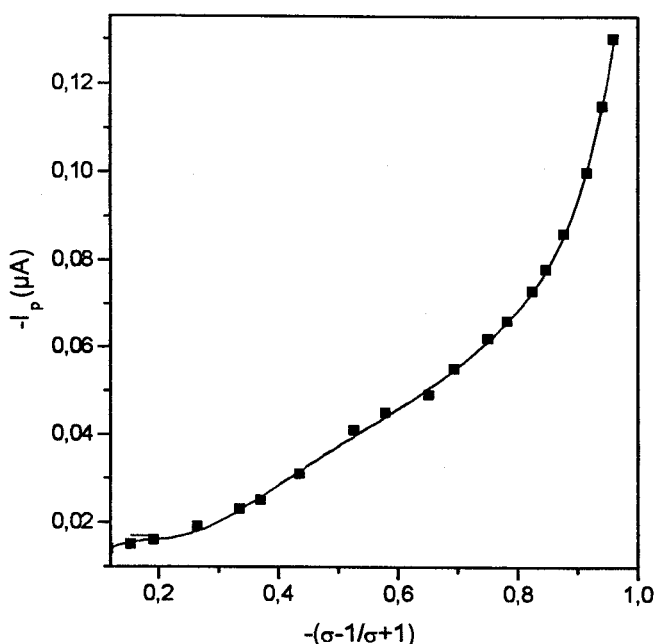


Figura 5.10.2.4.
Estudio de la reversibilidad. Relación entre I_p y $\sigma-1/\sigma+1$ (para $n=2$).

5.10.3. ESTUDIO DE LA REVERSIBILIDAD MEDIANTE VOLTAMPEROMETRÍA CÍCLICA.

La voltamperometría de barrido lineal y la voltamperometría cíclica que puede considerarse una extensión de la anterior, son especialmente útiles para el conocimiento de mecanismos de procesos redox, gracias a su capacidad para registrar de forma rápida la evolución del sistema al aplicar una variación de potencial lineal con el tiempo, en un amplio intervalo.

De las expresiones que nos dan el valor de I_p , se deduce que para procesos controlados por difusión, tanto reversibles como irreversibles, I_p es proporcional a $V_b^{1/2}$ (raíz cuadrada de la velocidad de barrido aplicada), lo cual constituye un criterio útil para establecer la naturaleza del proceso en estudio.

En cuanto a la voltamperometría cíclica, que consiste en la aplicación de un barrido lineal de potenciales de forma cíclica o triangular sobre un electrodo estacionario, se rige igualmente por las expresiones de la voltametría de barrido lineal ya que se trata de una extensión de ésta.

Una característica importante de esta técnica es que los productos originados en un barrido pueden, a su vez, ser electroactivos dando lugar a señales en el barrido opuesto, dado que se trabaja sobre un electrodo estacionario y en tiempos relativamente cortos. Es una característica especialmente importante en la evolución de mecanismos de electrodo y en estudios previos a la aplicación de técnicas de preconcentración.

Para aportar información que permita confirmar la naturaleza de los procesos de reducción del producto que se origina por la oxidación previa de la lidocaína, se estudió la influencia de la velocidad de barrido en voltamperometría cíclica. Para ello se preparó en un matraz de 25 ml una muestra conteniendo lidocaína previamente oxidada en concentración de 10^{-4} M y a un pH de 2.8. Se estudió la evolución del potencial y la intensidad de pico en los voltamperogramas obtenidos a velocidades de barrido diferentes entre 40 y 1200 mV/s. En la tabla 5.10.3.1 se encuentran los valores obtenidos.

Tabla 5.10.3.1.
Variación de la intensidad de pico con la velocidad de barrido en los voltamperogramas obtenidos por voltamperometría de barrido lineal.

$V_b(\text{mV/s})$	$V_b^{1/2}$	$I_p(\mu\text{A})$
40	6.32	-0.032
70	8.37	-0.045
80	8.94	-0.048
100	10.00	-0.059
200	14.14	-0.076
400	20.00	-0.105
500	22.36	-0.116
600	24.49	-0.127
900	30.00	-0.167
1000	31.62	-0.175
1100	33.17	-0.185
1200	34.64	-0.200

La representación de I_p en función de $V_b^{1/2}$ se muestra en la figura 5.10.3.1, donde se observa una dependencia lineal entre ambas variables según la ecuación:

$$-I_p = -0.00362 + 0.00565 V_b^{1/2}$$

siendo el coeficiente de correlación de 0.997.

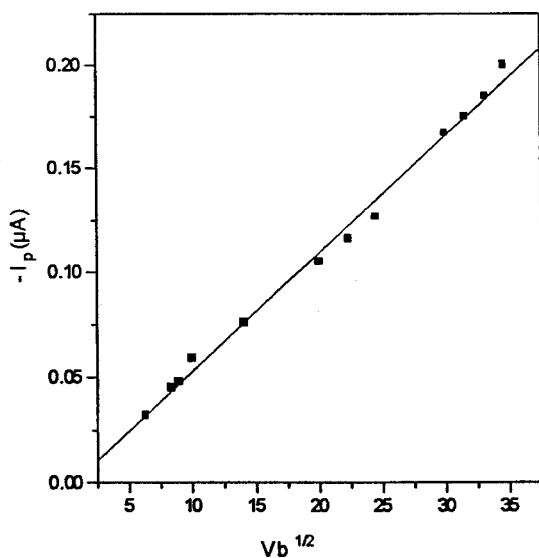


Figura 5.10.3.1.
Representación de intensidad de pico en función de $V_b^{1/2}$.

La variación de I_p con $V_b^{1/2}$ pone de manifiesto, de acuerdo con los fundamentos teóricos expresados, que el proceso responsable de dicha onda está controlado por difusión de la sustancia electroactiva hacia el electrodo de trabajo, confirmándose, por lo tanto, los resultados encontrados por PPD.

Igualmente se comprobó la irreversibilidad del proceso redox responsable de la onda de reducción mediante la técnica de voltamperometría cíclica ya que se obtiene únicamente señal de reducción, sin aparecer en el barrido anódico la señal de oxidación correspondiente.

En la tabla 5.10.3.2 se encuentran los valores de $n_a\alpha$ para la onda de reducción del compuesto en estudio, calculados a partir de la diferencia entre E_p y $E_{1/2}$ aplicando la siguiente ecuación:

$$E_p - E_{1/2} = \frac{0.048}{n_a\alpha}$$

Como puede observarse en dicha tabla a medida que aumenta la velocidad de barrido el potencial de pico se va desplazando hacia valores más negativos, comportamiento que corrobora la irreversibilidad del proceso de reducción del producto de oxidación de la lidocaína.

Tabla 5.10.3.2.
Estimación del factor $n_a\alpha$.

V_b (mV/s)	E_p (V)	$E_{1/2}$ (V)	$n_a\alpha$
40	-0.503	-0.423	0.6
70	-0.496	-0.412	0.57
80	-0.498	-0.385	0.42
100	-0.513	-0.407	0.45
200	-0.535	-0.417	0.41
400	-0.566	-0.455	0.43
500	-0.591	-0.485	0.45
600	-0.598	-0.461	0.35
900	-0.618	-0.501	0.41
1000	-0.635	-0.524	0.43
1100	-0.640	-0.519	0.40
1200	-0.645	-0.528	0.41
$n_a\alpha$ media =			0.44±0.07

5.11. DETERMINACIÓN DEL COEFICIENTE DE DIFUSIÓN Y DEL NÚMERO DE ELECTRONES.

Para el cálculo del valor del coeficiente de difusión se aplica la siguiente ecuación:

$$I_l = 708nD^{1/2}Cm^{2/3}\tau^{1/6}$$

donde I_l se mide en A, n es el número de Faradays de electricidad por mol de reactivo, m es la velocidad del flujo de mercurio en kg/s, τ es el tiempo de gota controlado electrónicamente en segundos, C es la concentración de reactivo en mol/m³ y el coeficiente 708 agrupa varias constantes. El método consiste en representar la corriente de difusión en función de la concentración de la especie electroactiva, manteniendo constante los demás parámetros. A partir del valor obtenido para la pendiente de la recta, P , se calcula el valor del coeficiente de difusión, D , mediante la relación:

$$D = \left[\frac{P}{(708nm^{2/3}\tau^{1/6})} \right]^2$$

donde $m=4.55 \times 10^{-7}$ kg/s y $\tau= 1$ s.

En la tabla 5.11.1 se exponen los valores de intensidad límite obtenidos por polarografía tast correspondientes a la onda de reducción del producto de oxidación de la lidocaína a distintas concentraciones, manteniendo el pH de 2.8. En la figura 5.11.1 se representan estos valores.

Tabla 5.11.1.
Variación de la intensidad límite con la concentración del producto de oxidación de la lidocaína.

C(mol/m ³)	I _l (A)
0.02	7.4×10 ⁻⁸
0.04	1.07×10 ⁻⁷
0.06	1.42×10 ⁻⁷
0.08	1.72×10 ⁻⁷
0.10	2.11×10 ⁻⁷

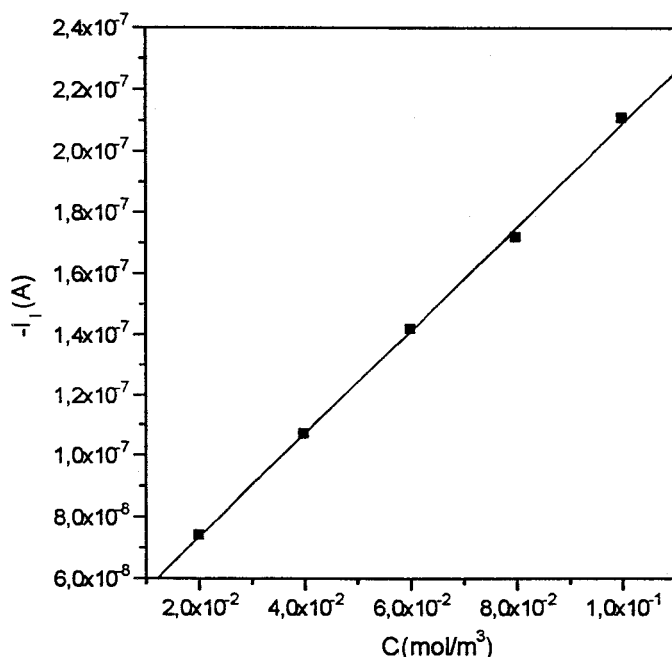


Figura 5.11.1.

Cálculo del coeficiente de difusión a través de la pendiente obtenida de la representación de la intensidad límite con respecto a la concentración de la especie electroactiva.

Esta representación muestra una dependencia lineal entre las magnitudes representadas poseyendo un coeficiente de correlación de 0.9994. La ecuación que muestra esta dependencia lineal es la siguiente:

$$-I_l = 3.95 \times 10^{-8} + 1.695 \times 10^{-6} C$$

Sustituyendo el valor de la pendiente de la recta en la expresión anterior obtenemos un valor de coeficiente de difusión de $4,09 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$.

Una vez calculados los potenciales iniciales y finales y el coeficiente de difusión se realiza la cronoculombimetría para cada una de las concentraciones utilizadas en el cálculo del coeficiente de difusión aplicando estos potenciales. Los valores de Q y $t^{1/2}$ obtenidos son representados con el fin de calcular el número de electrones a través de la pendiente de dicha gráfica que coincide con la expresión $2nFAD_o^{1/2}C_o^* / \pi^{1/2}$. Sustituyendo en esta ecuación y despejando n obtendríamos el

número de electrones que participan en el proceso de reducción del aminoóxido formado en la oxidación previa de la lidocaína. En la tabla 5.11.2. se exponen los valores de la pendiente obtenida al representar los valores de Q y $t^{1/2}$ para cada una de las concentraciones del aminoóxido derivado de la lidocaína, así como el cálculo del número de electrones.

Tabla 5.11.2.
Cálculo del número de electrones que participan en el proceso de reducción del aminoóxido derivado de la lidocaína. pH 2.8.

$C(\text{mol}/\text{m}^3)$	Pendiente ($C/s^{1/2}$)	no. de electrones
2×10^{-2}	$5,34 \times 10^{-8}$	2.33
6×10^{-2}	$1,47 \times 10^{-7}$	2.14
8×10^{-2}	$1,79 \times 10^{-7}$	1.95
1×10^{-1}	$2,43 \times 10^{-7}$	2.12
$n^{\circ}_{\text{medio}} \text{ electrones} =$		2.14 \pm 0.13

Este cálculo se repitió en muestras cuya concentración de lidocaína fue de 10^{-4} M y para valores de pH de 4.5 y 6.0. En la tabla 5.11.3. se muestran los valores de las pendientes obtenidas en la representación de Q frente a $t^{1/2}$ y los valores de n correspondientes a cada valor de pH.

Tabla 5.11.3.
Cálculo de n mediante microcoulombimetría en muestras que contienen una concentración de 10^{-4} M en lidocaína a distintos pH.

pH	Pendiente ($C/s^{1/2}$)	n
4.5	2.30×10^{-7}	2.01
6.0	2.52×10^{-7}	2.20

A través de este estudio se deduce que tanto para pH 4.5 como para pH 6.0 el número de electrones involucrados es 2, al igual que a pH 2.8.

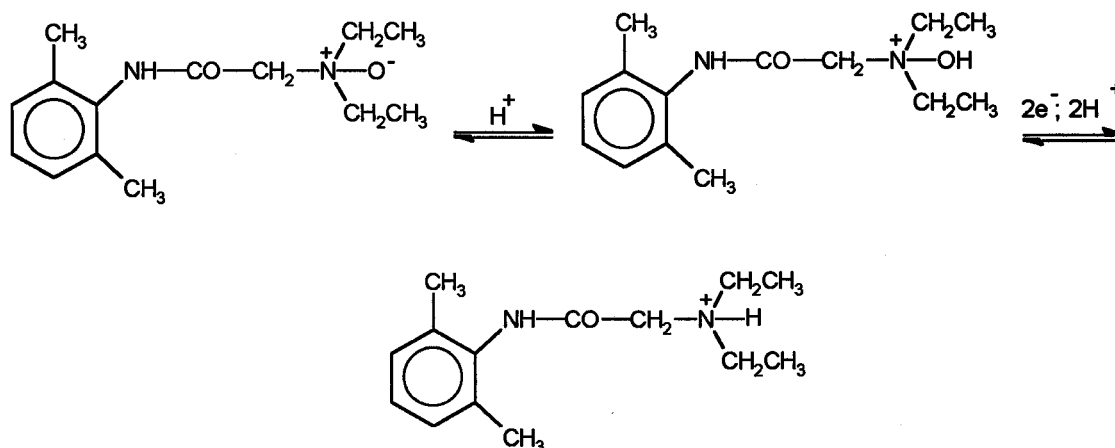
5.12. MECANISMO DE REDUCCIÓN DEL PRODUCTO DE OXIDACIÓN DE LA LIDOCAÍNA.

En el rango de pH ente 2.1 y 4.9 el valor de $n_a\alpha$ es igual a $0.57\pm 2\times 10^{-3}$. Utilizando la expresión:

$$\Delta E_{1/2} / \Delta pH = 0.059 p / (n_a\alpha)$$

se obtiene un valor de p (no. de protones) de aproximadamente 2.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos y de acuerdo con otras reducciones de compuestos similares aparecidas en la bibliografía (264)(265), se propone el siguiente mecanismo de reducción del aminoóxido:



5.13. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN.

Mediante este estudio no sólo se pretende conocer el rango lineal útil de concentraciones donde llevar a cabo la determinación analítica de la lidocaína, sino también ratificar el carácter difusivo del proceso de reducción que tiene lugar en la gota de mercurio del electrodo de trabajo. El intervalo de concentraciones estudiado ha sido el comprendido desde 2×10^{-6} a 2×10^{-3} M, a pH 2.8.

En la tabla 5.13.1 se encuentran los valores de intensidad de pico correspondientes a las concentraciones arriba mencionadas y en la figura 5.13.1 aparecen representadas las intensidades de pico en función de las concentraciones correspondientes al rango lineal. Como puede observarse en dicha figura, la relación entre la intensidad de pico y la concentración es lineal hasta 2×10^{-4} M. Además, para concentraciones superiores a 4×10^{-4} M el potencial de pico se desplaza a medida que aumenta la concentración de lidocaína.

Tabla 5.13.1.
Influencia de la concentración para la onda de reducción del producto de oxidación de la lidocaína.

C(M)	$I_p(\mu A)$
2.0×10^{-5}	-0.034
4.0×10^{-5}	-0.040
6.0×10^{-5}	-0.048
8.0×10^{-5}	-0.055
1.0×10^{-4}	-0.063
1.2×10^{-4}	-0.071
2.0×10^{-4}	-0.100
4.0×10^{-4}	-0.146
8.0×10^{-4}	-0.200
1.2×10^{-3}	-0.220
1.6×10^{-3}	-0.230

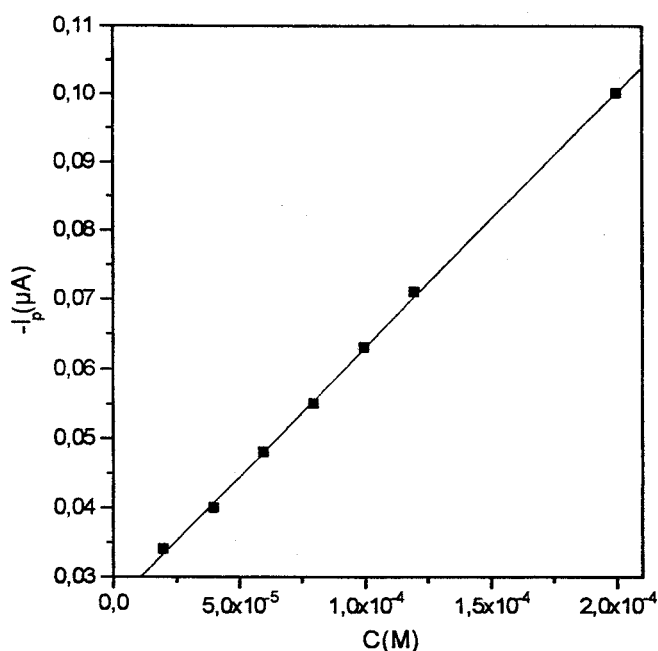


Figura 5.13.1.

Rango lineal de la intensidad de pico con la concentración de lidocaína.
El tramo lineal viene dado por la siguiente ecuación:

$$-I_p = 0.02583 + 371.2766C ; \text{ con un coeficiente de correlación de } 0.9997.$$

5.14. PROCEDIMIENTO RECOMENDADO PARA LA DETERMINACIÓN DE LIDOCAÍNA.

Se toman entre 0.135 a 1.35 μg de clorhidrato de lidocaína y se añaden 2 ml de peróxido de hidrógeno, 50 μl de hidróxido potásico y 0.25 ml de metanol. La solución obtenida se calienta durante 10 min. a 60 °C, después de lo cual se añade 12.5 ml de agua Milli-Q, 50 μl de ácido fosfórico 0.67 M y 10 μl de catalasa. Se espera durante 5 min. Para que tenga lugar la eliminación del exceso de peróxido de hidrógeno y una vez finalizado este tiempo se añade 5 ml del tampón fosfato 1 M de pH 2.8.

Una vez preparadas las muestras, se introducen en la celda polarográfica donde se les hace pasar nitrógeno durante 10 min., tras los cuales, se registran los polarogramas correspondientes bajo las condiciones operacionales de 1 s para el tiempo de goteo, -50 mV para la amplitud de pulso y 0.52 mm² para el tamaño de gota.

5.15. REPRODUCIBILIDAD Y SEGURIDAD DEL MÉTODO.

Para estudiar la reproducibilidad del método propuesto se prepararon 9 muestras iguales, de concentración 10⁻⁴ M y de pH 2.8, cuyos polarogramas se registraron entre 0 y -0.9 V. Se calcularon los parámetros estadísticos (\bar{y} (I_p , μA); s ; s_m y % E) que se recogen en la tabla 5.15.1.

$$\bar{y} = \sum_{i=1}^n y_i \quad s = \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}{n} \quad s_m = \frac{s}{\sqrt{n}} \quad \%E = \frac{s_m}{\bar{y}} \times 100$$

Tabla 5.15.1.
Reproducibilidad y seguridad del método. Parámetros estadísticos.

$\bar{y}(I_p, \mu\text{A})$	-0.0656
S	8.16×10^{-4}
s_m	2.72×10^{-4}
%E(P=0.05)	0.4

5.16. ESTUDIO DE LOS LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN.

Se realizaron medidas por PPD de la intensidad de pico en 7 muestras cuyas señales resultaron estar comprendidas entre 1 y 30 veces la señal de blanco, efectuando ocho replicados de cada medida (259). En la tabla 5.16.1 se encuentran los valores de intensidad de pico medios obtenidos y en la figura 5.16.1 se han

representado dichos valores. En la tabla 5.16.2 se encuentran los resultados de la calibración junto con los límites de detección y cuantificación.

Tabla 5.16.1.
Cálculo del límite de detección y cuantificación. Valores de intensidad de pico medios obtenidos de la medida de ocho replicados de cada concentración.

C(M)	$I_p(\mu\text{A})$ medio
2.0×10^{-5}	0.034
4.0×10^{-5}	0.041
6.0×10^{-5}	0.048
8.0×10^{-5}	0.056
1.0×10^{-4}	0.063
1.2×10^{-4}	0.071
2.0×10^{-4}	0.100

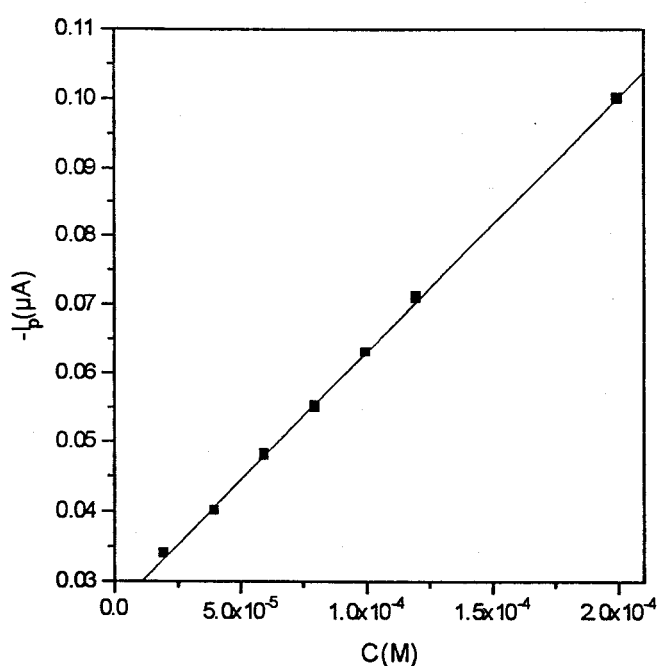


Figura 5.16.1.
Calibración de la determinación de la lidocaína (cada punto es el promedio de 8 replicados)

Tabla 5.16.2.
Límites de detección y cuantificación, y parámetros de regresión para la determinación de la lidocaína por PPD.

Qo	0.026
q1	370.9
R	0.9997
LOD	1.2×10^{-6} M
LOQ	3.7×10^{-6} M

5.17. ESTUDIO DE INTERFERENCIAS.

Para llevar a cabo este estudio se prepararon muestras de lidocaína de 4×10^{-5} M y de pH 2.8, a las que se añadieron distintas cantidades de especies extrañas elegidas en función de su grupo funcional.

Las muestras fueron preparadas tal y como se indica en el procedimiento propuesto, introduciendo en cada una de ellas una cantidad de especie extraña antes del proceso de oxidación de la lidocaína. En la tabla 5.17.1 se muestran las relaciones máximas permitidas de especie extraña/lidocaína, tomando como criterio de que existen interferencias cuando el porcentaje de error encontrado es superior al 5 %.

Tabla 5.17.1.
Estudio de interferencias.

Relación especie extraña/ lidocaína	Especie extraña
100	2-aminopiridina, 1,4-dioxano, urea, creatina.
50	4-metoxibenzaldehído.
10	Alcohol n-amílico, alcohol bencílico, anhídrido ftálico, dimedona, glioxal.
5	Ácido cloroacético, ácido iminodiacético, sal sódica del ácido 2-naftalennosulfónico, ácido amidosulfúrico, ácido tiobarbitúrico.
<1	dibucaína, prilocaína.

En general podemos decir que las especies probadas interfieren relativamente poco a excepción de los anestésicos locales, dibucaína y prilocaína, que por tener en

su estructura grupos amina secundaria, reaccionan de igual manera que la lidocaína con el agua oxigenada.

5.18. APLICACIONES

En este apartado se estudia la determinación de lidocaína en dos formulaciones de uso tópico (Otomidrin y Panotile) y dos pomadas (Proctium y Synalar Rectal) utilizando y comparando dos métodos de determinación, uno de los cuales es el empleado por la farmacopea estadounidense para la determinación de lidocaína en preparaciones farmacéuticas y el otro método es el propuesto en este trabajo mediante polarografía diferencial de pulso.

La composición de cada una de las formulaciones farmacéuticas empleadas se expone a continuación:

* Otomidrin (Laboratorios de aplicaciones farmacodinámicas S.A.): Sulfato de framicitina, acetónido de fluocinolona, clorhidrato de lidocaína (cada ml de fármaco contiene 20 mg), imidazolidinilurea, polietilenglicol y agua purificada.

* Panotile (Zambon S.A.): Clorhidrato de furaltadona, sulfato de polimixina B, sulfato de neomicina, acetato de fludrocortisona, clorhidrato de lidocaína (cada ml de fármaco contiene 40 mg), glicerina, propilenglicol, cloruro de benzalconio y agua desionizada en cantidad suficiente.

* Proctium (Laboratorios Dr. Esteve S.A.): Dobesilato de calcio, prednisolona, clorhidrato de lidocaína (cada gramo de fármaco contiene 4 mg), vaselina líquida, vaselina blanca filante, propilenglicol, palmito estearato de glicerol y polioxietilenglicol, monooleato de sorbitán polioxietilenado, perfume, propilparabeno, metilparabeno, edeato disódico y butilhidroxianisol.

* Synalar rectal (Syntex latino S.A.): Acetónido de fluocinolona, mentol, subgalato de bismuto, clorhidrato de lidocaína (cada gramo de pomada contiene 20 mg).

El método descrito por la farmacopea estadounidense para la determinación de la lidocaína en los dos primeros fármacos utiliza HPLC (266), mientras que para las pomadas utiliza una valoración potenciométrica.

Para aplicar el método propuesto en esta Memoria se procedió a una extracción previa de la lidocaína, tanto para las formulaciones de uso tópico como para las pomadas, debido a la necesidad de separar ésta de las demás sustancias presentes en el fármaco que pudieran actuar como interferentes.

Para formulaciones de uso tópico:

Se toma una cantidad de formulación equivalente a 40 mg de clorhidrato de lidocaína, cantidad que se mezcla con 10 ml de cloroformo, agitándose durante 10 minutos, transcurridos los cuales se separa la fase acuosa de la orgánica. A la fase acuosa se le añade de nuevo 10 ml de cloroformo, agitándose ambas fases durante 10 minutos y separándose de nuevo ambas fases. Se deshecha la fase orgánica y se trasvasa la fase acuosa a un matraz de 50 ml, enrasándose con agua Milli-Q. De esta disolución se toman 0.85 ml y se determina la lidocaína según el procedimiento recomendado en el apartado 5.14.

Para pomadas:

Se pesa aproximadamente 1 g de pomada y se disuelve en 40 ml de cloroformo. La disolución así obtenida se pasa a un embudo de decantación de 250 ml y se añaden 10 ml de agua Milli-Q y 20 ml de ácido fosfórico 0.1 M. Se agita el contenido del embudo durante 10 min. y se extrae la fase acuosa. Sobre la fase orgánica contenida en el embudo se añaden de nuevo 10 ml de agua Milli-Q y 10 ml de ácido fosfórico 0.1 M. Se agita durante otros 10 min. y se extrae la fase acuosa. A continuación se añaden otros 10 ml de agua Milli-Q y 5 ml de ácido fosfórico 0.1 M en el embudo y se agita el contenido del mismo durante 10 min. separando la fase acusa al finalizar dicho tiempo. Por último se añaden a la fase orgánica 10 ml de agua Milli-

Q, se agita durante 5 min. y se separa la fase acuosa. Todas las fase acuosas obtenidas en cada extracción se unen y se ajusta su pH a 5.2 mediante la utilización del tampón fosfórico 1M de ese pH. Una vez obtenido el pH deseado, la disolución se enrasa a 100 ml con agua Milli-Q.

Una vez preparadas las muestras, éstas se trasvasan a la celda polarográfica donde se les pasa nitrógeno durante 10 minutos, tras lo cual se registran los polarogramas correspondientes siguiendo la técnica PPD. Las intensidades de pico obtenidas para cada muestra se sustituyen en la ecuación de la recta de calibrado expuesta en el apartado 5.13 del presente capítulo, despejando en cada caso el valor de concentración obtenida para cada muestra.

En la tabla 5.18.1 se recoge la cantidad de lidocaína que se obtiene según los métodos empleados en las porciones de fármacos tomados, habiéndose llevado a cabo tres determinaciones independientes por cada muestra.

Tabla 5.18.1.
Aplicaciones. Resultados para la determinación de lidocaína en distintos fármacos.
Los valores se encuentran expresados en mg/ml (a) y mg/g (b).

Muestra	PPD*	Valoración potenciométrica*	HPLC*
Otomidrin ^a	19.15±0.91		19.58±0.15
Panotile ^a	38.66±0.87		39.87±0.24
Synalar ^b	19.54±0.56	19.85±0.43	
Proctium ^b	3.92±0.17	3.94±0.11	

* Media de tres determinaciones.

La comparación de ambos métodos se establece suponiendo la hipótesis nula de que las medias de las muestras no difieren significativamente de cero teniendo en cuenta que sus desviaciones estándar no diferían de forma significativa. Así pues, y empleando las siguientes ecuaciones:

$$s^2 = \frac{\{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2\}}{(n_1 + n_2 - 2)}$$

$$t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{s \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

se calcula el valor de s (desviación estándar ponderada) para Otomidrin y Panotile, siendo de 0.66 y 0.64, respectivamente. El valor de t obtenido para ambos fármacos a partir del valor de s es de 0.80 y 2.26. El valor crítico de |t| ($\nu=4$, $P=0.05$) es 2,78, mayor que los obtenidos experimentalmente, con lo que se acepta la hipótesis nula. Se puede afirmar, entonces, que no existen diferencias significativas entre ambos métodos.

Se calculan los valores de s para Synalar y Proctium, siendo 0.50 y 0.14 respectivamente. El valor de t calculado resulta ser 0.76 y 0.17, respectivamente. El valor crítico de |t| ($\nu=4$, $P=0.05$) es 2.78, mayor que los valores experimentales y por tanto se acepta la hipótesis nula, es decir, no existen diferencias significativas entre ambos métodos.

CAPÍTULO VI
ESTUDIO DE LA ELECTROOXIDACIÓN
DE LA PRILOCAÍNA Y LIDOCAÍNA EN
EL ELECTRODO DE PASTA DE
CARBONO. DETERMINACIÓN DE
PRILOCAÍNA Y LIDOCAÍNA POR
VOLTAMPEROMETRÍA CON EPC
ESTACIONARIO Y ROTATORIO,
RESPECTIVAMENTE.

Debido a que tanto la prilocaína como la lidocaína no se reducen directamente en el electrodo de mercurio, se estudió la oxidación de ambos utilizando el electrodo de pasta de carbono (EPC), con el fin de conseguir una determinación electroquímica de estos compuestos rápida y sencilla.

El electrodo de pasta de carbono puede utilizarse en voltamperometría, voltamperometría inversa, amperometría y potenciometría como electrodo indicador en un rango de potenciales comprendido entre -1.5 y +1.5 V. El EPC sólo puede usarse en disoluciones acuosas dado que los disolventes orgánicos pueden disolver la parte de pasta en contacto con el líquido (262). Su preparación se lleva a cabo antes de utilizarlo limpiando previamente la superficie activa (o de contacto directo) al objeto de evitar contaminaciones de las disoluciones.

Para el relleno del electrodo se utilizó carbono en polvo de calidad espectroscópica. (Las características de este grafito son las siguientes: densidad del poro 0.7 g/cm³; densidad de toma 8.8 g/cm³; tamaño del grano (máx) 100 µm. El máximo nivel de impurezas por elementos es de 0.5 ppm siendo el máximo de impureza total de 5 ppm.

Para la preparación de la pasta de carbono se pesan 5 g de grafito y se mezclan en un mortero con 1.8 ml de parafina líquida (Nújol) durante 15 minutos quedando la mezcla con apariencia seca, ligeramente polvorienta y aspecto satinado al comprimirla con la mano del mortero. Una vez preparada se trasvasa con una espátula a un frasco apropiado con tapón y se guarda en un lugar fresco y sin humedad.

El electrodo de trabajo utilizado fue un electrodo de carbono vitrificado al que se ha practicado una oquedad en su extremo con objeto de introducir en la misma la pasta de carbono. Las dimensiones de esta oquedad son de 3 mm de diámetro y 1 mm de altura.

Después de cada medida se retira la pasta, se limpia la oquedad con etanol, secándola a continuación, y se rellena de nuevo la oquedad con pasta "fresca" quedando el electrodo listo para otra medida.

6.1. ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO ELECTROQUÍMICO DE LA PRILOCAÍNA CON ELECTRODO DE PASTA DE CARBONO

En este apartado se estudian los factores que afectan a la oxidación de la prilocaína sobre el electrodo rotatorio de pasta de carbono utilizando las técnicas voltamperométricas DC, diferencial de pulso y cíclica.

La prilocaína puede ser oxidada en el electrodo de pasta de carbono como se desprende de las respuestas voltamperométricas obtenidas en una serie de estudios preliminares. En la figura 6.1 se encuentran representados los voltamperogramas obtenidos con electrodo rotatorio de pasta de carbono de una muestra de 10^{-4} M en prilocaína a pH 7.0. La velocidad de rotación es de 3000 r.p.m, la velocidad de barrido es de 5.1 mv/s y la amplitud de pulso es 50 mV en el caso de la voltamperometría diferencial de pulso.

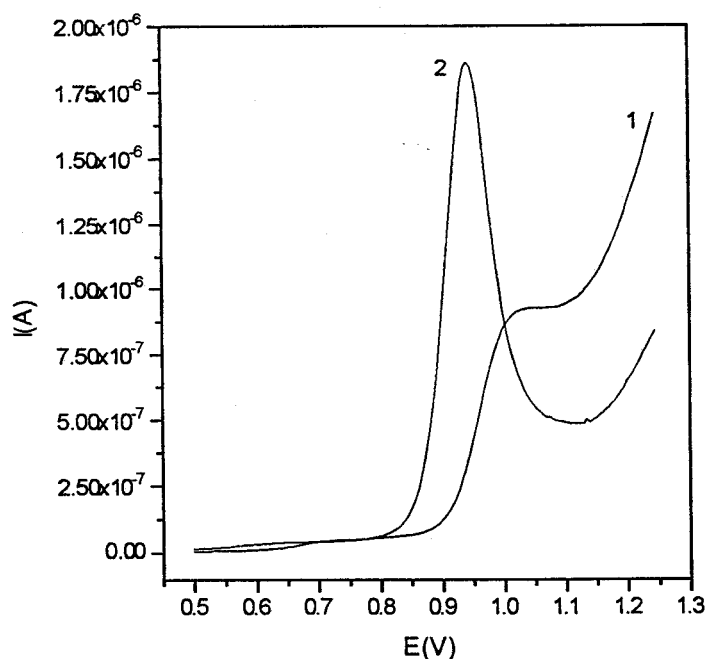


Figura 6.1.
Voltamperogramas DC (1) y diferencial de pulso (2) de prilocaína 10^{-4} M y pH 7.0
utilizando como electrodo de trabajo el electrodo de pasta de carbono.

6.1.1. INFLUENCIA DE LA VELOCIDAD DE ROTACIÓN DEL ELECTRODO DE PASTA DE CARBONO.

Para realizar este estudio se prepararon muestras de prilocaína en matraces de 25 ml, conteniendo una concentración de compuesto de 10^{-4} M y a un pH de 8.5 ajustado utilizando 5 ml de tampón fosfato 0.2 M. Las condiciones de medidas para voltamperometría diferencial de pulsos fueron +50 mV como amplitud de pulso y velocidades de rotación que oscilaban entre 0 y 3000 rpm.

En la tabla 6.1.1 se muestran los valores de velocidad de rotación aplicados, así como los valores obtenidos de la intensidad y potencial de pico de oxidación de la prilocaína y en la figura 6.1.1 se representa la intensidad de pico en función de la raíz cuadrada de la velocidad de rotación. Se observa que la intensidad de pico disminuye cuando aumenta la velocidad de rotación, lo que podría ser debido a procesos de adsorción, por lo que se siguió el estudio de este compuesto con el electrodo en reposo.

Tabla 6.1.1.
Estudio de la influencia de la velocidad de rotación en la señal de oxidación de la prilocaína.

w (rpm)	$I_p(\mu A)$	$E_p(V)$
0	2.340	0.97
500	2.199	0.98
1000	1.806	0.99
1500	1.415	1.02
2000	1.293	1.03
2500	1.245	1.05
3000	1.212	1.06

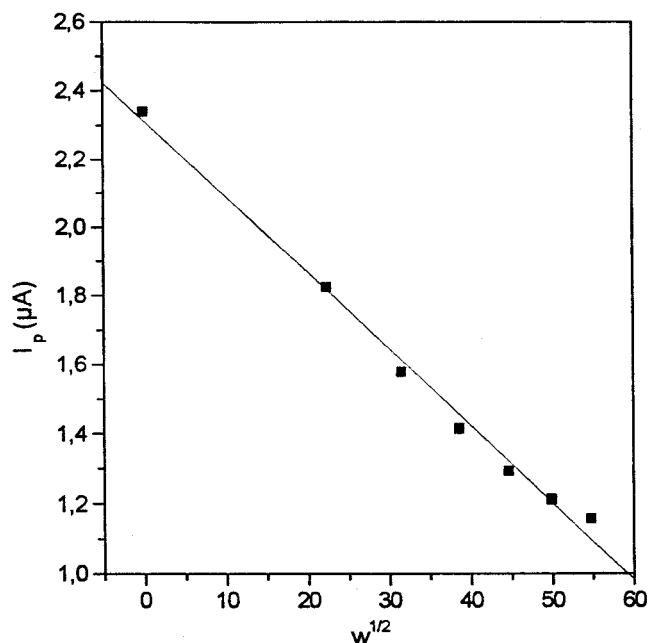


Figura 6.1.1.
Estudio de la influencia de la velocidad de rotación en la señal de oxidación de la prilocaína. Representación de la intensidad de pico en función de la raíz cuadrada de la velocidad de rotación.

6.1.2. INFLUENCIA DEL pH.

Para estudiar la influencia del pH se prepararon muestras de prilocaína 10^{-4} M en matraces de 25 ml, que contenían volúmenes variables hasta un total de 5ml de ácido fosfórico 0.2 M y hidróxido sódico 0.2 M, de forma que siempre se mantenga constante la fuerza iónica, con el fin de ajustar el pH entre 5.0 y 11.00, y agua Milli-Q hasta completar un volumen de 25 ml. Las muestras fueron trasvasadas a la celda polarográfica donde se les pasó nitrógeno durante 10 min. Y transcurridos estos se procedió al registro de los voltamperogramas por PPD sobre el EPC aplicando una amplitud de pulso de 50 mV y una velocidad de barrido de 5.1 mV/s.

En la tabla 6.1.2 se recogen los valores de intensidad y potencial de pico de la señal de oxidación de la prilocaína y los correspondientes valores de pH y en las

figuras 6.1.2.1 y 6.1.2.2 se representan la intensidad y potencial de pico frente al pH, respectivamente.

En la figura 6.1.2.1 se observa que la señal de oxidación aumenta su altura a medida que aumenta el pH hasta alcanzar un valor máximo a pH 8.5, tras el cual la altura de ésta comienza a disminuir. Para valores de pH inferiores a 5.0 la señal de oxidación prácticamente no se observa y a valores de pH superiores a 11.0 se confunde con la señal perteneciente al electrolito soporte.

Tabla 6.1.2.1.
Estudio de la influencia del pH sobre la señal de oxidación de la prilocaína. Valores de pH, intensidad y potencial de pico.

pH	I_p (μA)	E_p (V)
5.0	0.179	1.08
6.0	0.746	1.02
7.0	1.620	0.94
8.0	1.910	0.88
8.5	2.350	0.86
9.0	1.950	0.84
9.5	1.400	0.82
10.0	1.190	0.81
11.0	0.975	0.78

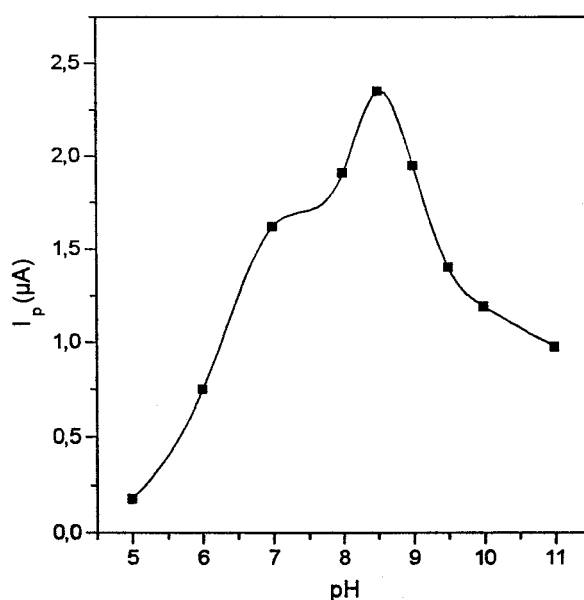


Figura 6.1.2.1.
Estudio de la influencia del pH sobre la señal de oxidación de la prilocaína.
Representación de la intensidad en función del pH.

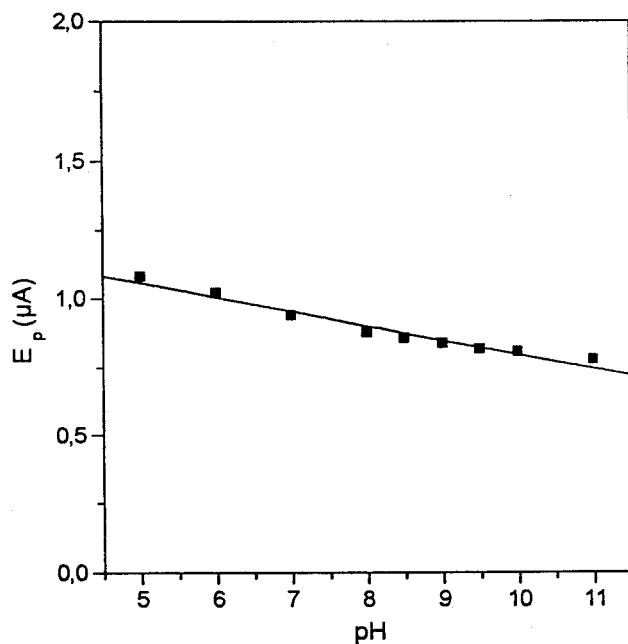


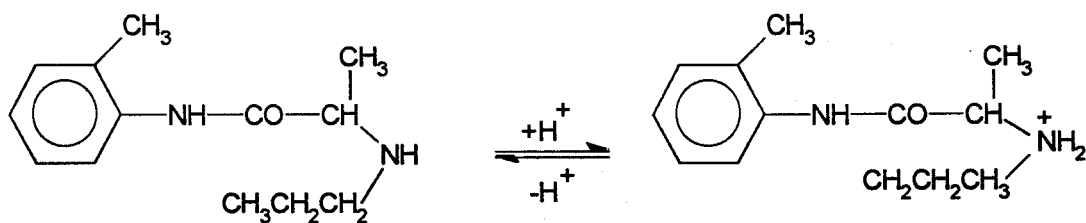
Figura 6.1.2.2.

Estudio de la influencia del pH sobre la señal de oxidación de la prilocaína.
Representación del potencial de pico en función del pH.

En la figura 6.1.2.2 se observa una dependencia lineal entre el potencial de pico y el pH que muestra cómo los protones intervienen en el proceso. Esta dependencia lineal viene dada por la siguiente ecuación:

$$E_p = 1.3147 - 0.0514 \text{ pH} ; r=0.98.$$

Esta influencia del pH se debe a la protonación del grupo amino que es oxidado en el electrodo de pasta de carbono.



El pH elegido para posteriores estudios como el más adecuado es de 8.5 ya que a este pH la señal de oxidación de la prilocaína está bien definida y alcanza su máxima altura.

6.1.3. INFLUENCIA DE LA AMPLITUD DE PULSO APLICADO.

Para realizar este estudio se preparó una muestra de prilocaína de concentración de 10^{-4} M ajustada a pH 8.5 con tampón fosfato 0.2 M y se registraron los voltamperogramas correspondientes variando la amplitud de pulso desde +10 a +140 mV, manteniendo una velocidad de barrido de 5 mV/s.

En la tabla 6.1.3 aparecen los valores de amplitud de pulso aplicado y los valores de intensidad y potencial de pico obtenidos para la señal de oxidación de la prilocaína y en la figura 6.1.3 se representa la intensidad de pico en función de la amplitud de pulso aplicado. A medida que aumenta la amplitud de pulso aumenta la intensidad de pico, mientras que el potencial de pico disminuye suavemente. Para posteriores estudios se ha escogido el valor de +50 mV como amplitud de pulso por aportar buena sensibilidad y resolución.

Tabla 6.1.3.
Estudio de la influencia de la amplitud de pulso aplicada sobre la señal de oxidación de la prilocaína.

ΔE (mV)	I_p (μA)	E_p (V)
10	0.231	0.870
20	0.672	0.868
30	1.140	0.865
40	1.710	0.862
50	2.250	0.857
60	2.980	0.854
70	3.730	0.849
80	4.380	0.845
90	5.110	0.842
100	5.980	0.837
110	6.750	0.834
120	7.190	0.831
130	7.520	0.828
140	7.810	0.825

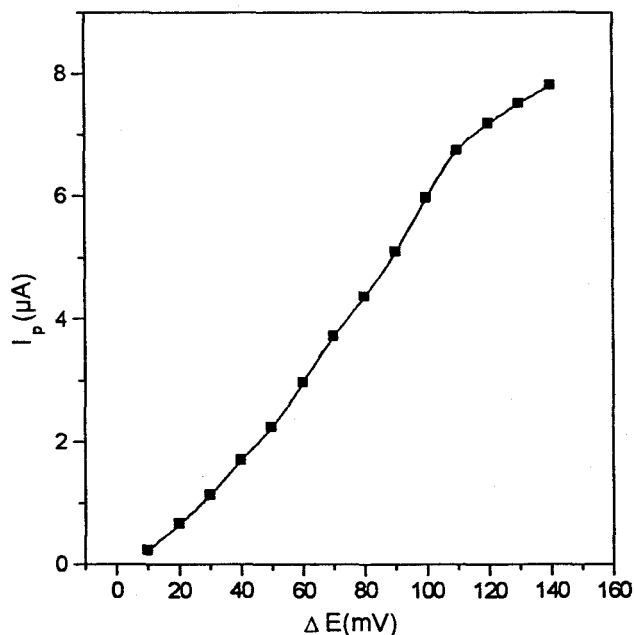


Figura 6.1.3.

Variación de la intensidad de pico con la amplitud de pulso sobre el EPC.

6.1.4. INFLUENCIA DE LA VELOCIDAD DE BARRIDO

En este apartado se estudió la influencia de la velocidad de barrido de potencial sobre una disolución de prilocaína 10^{-4} M ajustada a pH 8.5 con tampón fosfato 0.2 M. La amplitud de pulso utilizada fue de +50 mV.

En la tabla 6.1.4 se muestran los valores obtenidos de intensidad y potencial de pico para distintos valores de velocidad de barrido y en la figura 6.1.4 se representa la intensidad de pico en función de la velocidad de barrido. Se observa que, en el intervalo estudiado, los valores de la intensidad de pico crecen al aumentar la velocidad de barrido de potencial.

Tabla 6.1.4.
Estudio de la influencia de la velocidad de barrido sobre la señal de oxidación de la prilocaína.

V_{barrido} (mV/s)	I_p (μA)	E_p (V)
1	1.552	0.86
2	2.020	0.85
5	2.230	0.85
7	2.390	0.84
10	2.720	0.85
20	3.830	0.84

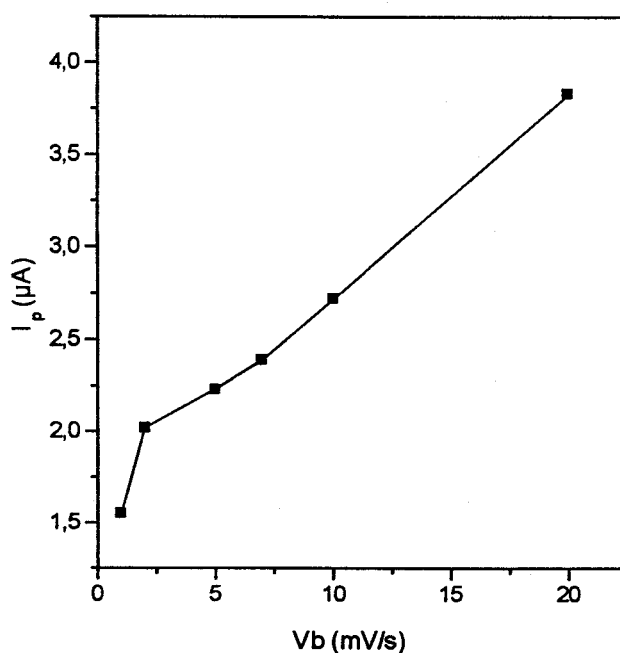


Figura 6.1.4.
Influencia de la velocidad de barrido sobre la intensidad de pico de la señal de oxidación de la prilocaína.

6.1.5. INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA.

Se estudio la influencia de la temperatura en muestras de las mismas características del apartado anterior manteniendo las mismas condiciones operacionales de medida y calentándolas entre 25 y 60 °C.

En la tabla 6.1.5 se recogen los valores de temperaturas aplicadas e intensidades de pico de la señal de oxidación de la prilocaína y en la figura 6.1.5 se

representan estos valores en los que se observa un aumento de la intensidad de pico con la temperatura, calculándose un coeficiente de temperatura de $1.43\% \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$.

Tabla 6.1.5.
Estudio de la influencia de la temperatura para la señal de oxidación de la prilocaína.

T ($^\circ\text{C}$)	$\log I_p$	$I_p(\mu\text{A})$
25	0.398	2.502
30	0.452	2.834
35	0.504	3.189
40	0.532	3.407
45	0.571	3.722
50	0.586	3.857
55	0.606	4.038
60	0.616	4.129

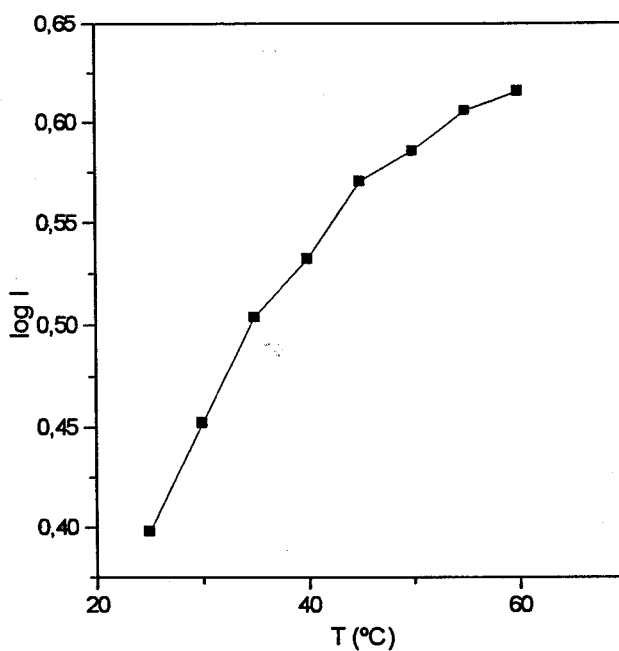


Figura 6.1.5.
Representación de la intensidad de pico en función de la temperatura para la señal de oxidación de la prilocaína.

6.1.6. ESTUDIO DE LA NATURALEZA DEL PROCESO DE OXIDACIÓN.

Para obtener información que permita elucidar la naturaleza del proceso de oxidación de la prilocaína, se estudió la influencia de la velocidad de barrido en voltamperometría cíclica en muestras que contenían 10^{-4} M en prilocaína a pH 8.5.

En la tabla 6.1.6.1. se han recogido los valores de velocidad de barrido e intensidad de pico y en la figura 6.1.6.1. se representa la intensidad de pico con respecto a la raíz cuadrada de la velocidad de barrido.

Tabla 6.1.6.1.
Influencia de la velocidad de barrido sobre la prilocaína por voltamperometría cíclica sobre EPC.

V_b (mV/s)	I_p (μ A)
5	0.644
10	0.906
20	1.540
30	2.008
40	2.289
50	2.767
60	2.978
70	3.256
80	3.564
90	3.908
100	4.165

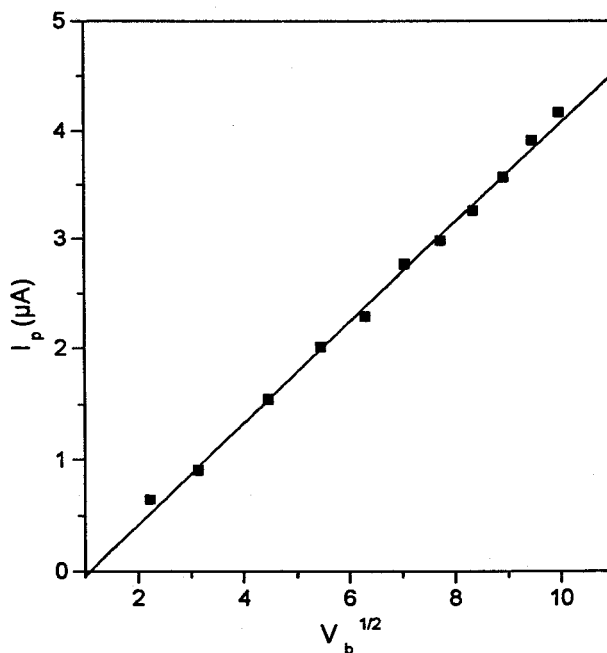


Figura 6.1.6.1.
Variación de la intensidad de pico en función de la raíz cuadrada de la velocidad de barrido.

Se observa que existe una relación lineal entre la intensidad de pico con la raíz cuadrada de la velocidad de barrido, confirmando, por tanto, el carácter difusivo del proceso de oxidación de la prilocaína en el electrodo estacionario de pasta de carbono.

Esta dependencia lineal viene dada por la siguiente ecuación:

$$I_p = -0.491 + 0.456V_b^{1/2}; r=0.998.$$

Por otra parte, se deduce la irreversibilidad del proceso de oxidación ya que mediante la técnica de voltamperometría cíclica se obtiene sólo señal de oxidación, sin aparecer en el barrido catódico la correspondiente señal de reducción, tal y como puede observarse en la figura 6.1.6.2.

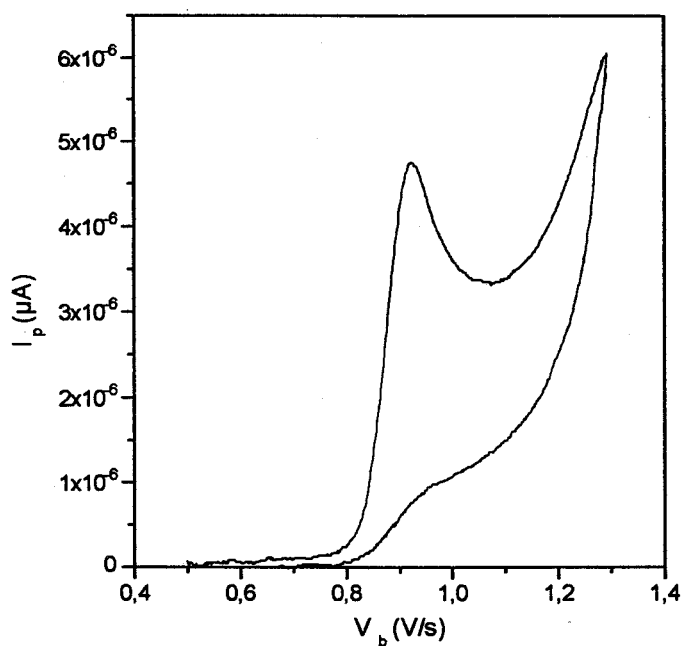


Figura 6.1.6.2.
Estudio de la reversibilidad mediante VC. ($V_b=90$ mV/s).

En la tabla 6.1.6.2 se encuentran los valores de $n_a\alpha$ correspondientes a la oxidación de la prilocaína, calculados a partir de los valores de E_p y $E_{1/2}$.

Tabla 6.1.6.2.
Estudio de la reversibilidad mediante VC. Cálculo de los valores de $n_a\alpha$.

V_b (mV/s)	E_p (V)	$E_{1/2}$ (V)	$n_a\alpha$
5	0.917	0.881	1.320
10	0.920	0.883	1.287
20	0.923	0.886	1.301
30	0.921	0.889	1.477
40	0.923	0.891	1.511
50	0.924	0.893	1.552
60	0.931	0.896	1.370
70	0.932	0.897	1.357
80	0.934	0.899	1.368
90	0.935	0.899	1.345
100	0.935	0.900	1.378
$n_a\alpha$ medio =			1.388±0.083

Se observa en esta tabla que a medida que aumenta la velocidad de barrido el potencial de pico se desplaza hacia valores más positivos indicando igualmente que se trata de un proceso irreversible.

6.1.7. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN.

Este estudio se llevó a cabo en un rango de concentraciones de 10^{-6} a 10^{-3} M en prilocaína a pH 8.5, observándose un rango lineal entre 10^{-6} a 10^{-4} M. En la tabla 6.1.7 se encuentran recogidos los valores obtenidos y en la figura 6.1.7 se representa la intensidad de pico en función de la concentración, sólo el rango lineal, que responde a la ecuación:

$$I_p = -0.010 + 23229.212 C ; r=0.999.$$

Tabla 6.1.7.
Estudio de la influencia de la concentración de la prilocaína. Velocidad de barrido de 5.1 mV/s y amplitud de pulso de +50 mV.

C (M)	I_p (μ A)
1×10^{-6}	0.0058
2×10^{-6}	0.0293
4×10^{-6}	0.0815
6×10^{-6}	0.1350
8×10^{-6}	0.2110
1×10^{-5}	0.2530
2×10^{-5}	0.4940
4×10^{-5}	0.9910
6×10^{-5}	1.440
8×10^{-5}	1.890
1×10^{-4}	2.270
2×10^{-4}	3.300
4×10^{-4}	6.160
6×10^{-4}	8.100
8×10^{-4}	10.50
1×10^{-3}	12.70

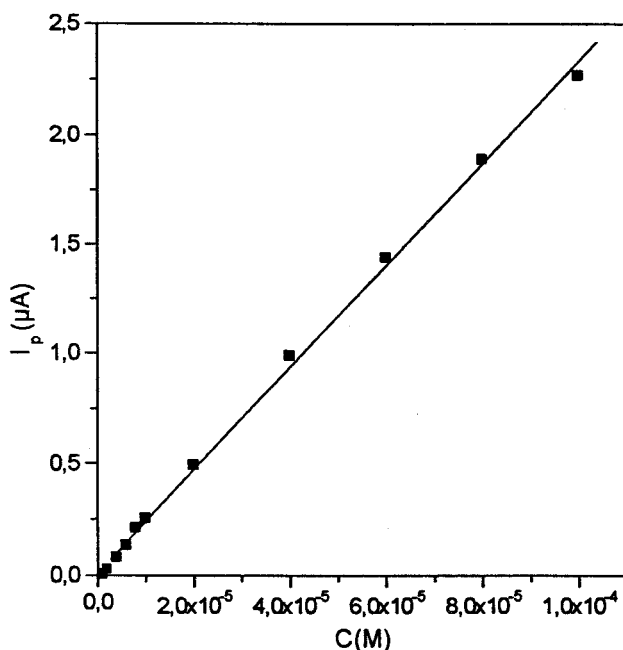


Figura 6.1.7.
Recta de calibrado de la prilocaína por voltamperometría diferencial de pulso sobre EPC. Velocidad de barrido de 5.1 mV/s y amplitud de pulso de +50 mV.

6.1.8. PROCEDIMIENTO RECOMENDADO PARA LA DETERMINACIÓN DE PRILOCAÍNA POR VOLTAMPEROMETRÍA DIFERENCIAL DE PULSO CON ELECTRODO DE PASTA DE CARBONO.

Se toman entre 6.42 y 642 µg de prilocaína 10^{-3} M, se añaden 5 ml de tampón fosfato 0.2 M para ajustar el pH a 8.5 y se enrasa a 25 ml con agua Milli-Q. La muestra es trasvasada a la celda polarográfica, donde se le pasa nitrógeno durante 10 min. Y posteriormente se registran los voltamperogramas utilizando las siguientes condiciones operacionales: 50 mV como amplitud de pulso y 5 mV/s como velocidad de barrido. A partir de las medidas de intensidad de pico y por comparación con la correspondiente recta de calibrado, se determina la concentración de prilocaína en la muestra problema.

6.1.9. REPRODUCIBILIDAD Y SEGURIDAD DEL MÉTODO.

Siguiendo el procedimiento descrito en el apartado anterior, se prepararon 9 muestras iguales que contenían prilocaína 10^{-4} M a pH 8.5 y se registraron sus voltamperogramas correspondientes. En la tabla 6.1.9. se recogen los parámetros estadísticos ($\bar{Y}(I_p, \mu A)$; S ; s_m y % E) obtenidos indicando buena reproducibilidad en las medidas.

$$\bar{Y} = \sum_{i=1}^n Y_i \quad S = \frac{\sum_{i=1}^n (Y_i - \bar{Y})^2}{n} \quad s_m = \frac{S}{\sqrt{n}} \quad \%E = \frac{s_m}{\bar{Y}} \times 100$$

Tabla 6.1.9.
Reproducibilidad y seguridad del método. Cálculo de parámetros estadísticos.

$\bar{Y}(I_p, \mu A)$	2.27
S	0.051
s_m	0.017
%E	0.75

6.1.10. ESTUDIO DE LOS LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN.

Siguiendo el procedimiento recomendado se prepararon y midieron por voltamperometría diferencial de pulso 11 muestras cuyas señales resultaron estar comprendidas entre 1 y 30 veces la señal de blanco, efectuando ocho replicados de cada medida (259). En la tabla 6.1.10. se encuentran los resultados de la calibración junto con los límites de detección y cuantificación para este fármaco.

Tabla 6.1.10.
Límites de detección y cuantificación, y parámetros de regresión para la determinación de la prilocaína y por voltamperometría diferencial de pulso sobre EPC.

q_0	-0.010
Q1	23229.70
r	0.9989
LOD	1.7×10^{-7} M
LOQ	5.2×10^{-7} M

Comparando estos resultados con los obtenidos a partir del pico de reducción de la nitrosamina derivada de la prilocaína sobre el electrodo de gotas de mercurio, vemos que utilizando el pico de oxidación sobre el EPC se alcanzan unos límites de detección y cuantificación más bajos. Por otra parte, la oxidación de la prilocaína sobre el EPC es inmediata y por tanto no se necesita llevar a cabo reacciones previas como en el caso de la reducción.

6.1.11. APLICACIONES.

Se ha comprobado la utilidad del método propuesto para la determinación de la prilocaína por voltamperometría diferencial de pulso en EPC aplicándolo a las mismas muestras que en el capítulo 4: una preparación farmacéutica comercial (Citanest) y cuatro muestras sintéticas conteniendo distintos compuestos orgánicos con distintos grupos funcionales. Las muestras se prepararon según el procedimiento recomendado. Una vez preparadas las muestras, se miden bajo las condiciones operacionales descritas en el procedimiento recomendado, empleando voltamperometría diferencial de pulsos con electrodo de pasta de carbono. En las tablas 6.1.10.1 y 6.1.10.2 se encuentran los resultados obtenidos.

Tabla 6.1.10.
Determinación de 10^{-5} M de prilocaína en varias muestras sintéticas.

Muestra	C_{media} (M)
1	1.01×10^{-5}
2	
3	
4	0.99×10^{-5}

Tal y como se observa en la tabla las recuperaciones están muy próximas al 100%.

Tabla 6.1.10.
Determinación de prilocaína en un fármaco (μg de prilocaína). Se han realizado tres replicados en cada método.

μg de clorhidrato de prilocaína según formulación	HPLC	Método propuesto
62.4	62.43 \pm 0.60	62.42 \pm 0.22

La comparación entre ambos métodos se lleva a cabo tomando como hipótesis nula que la diferencia entre las medias de ambos métodos no difieren significativamente de cero, comprobando anteriormente que sus desviaciones estándar no diferían de forma significativa. Así pues, y empleando las siguientes ecuaciones:

$$s^2 = \frac{\{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2\}}{(n_1 + n_2 - 2)}$$

$$t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{s \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

se dedujo un valor de t de 0.23 para 4 grados de libertad, siendo éste menor que el valor crítico de $|t|$ ($\nu=4$, $P=0.05$) que es de 2.78. Esto muestra que no hay diferencia significativa entre ambos métodos aceptándose, por tanto, la hipótesis nula propuesta.

6.2. ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO ELECTROQUÍMICO DE LA LIDOCAÍNA CON ELECTRODO DE PASTA DE CARBONO.

En unos ensayos previos sobre una muestra que contenía lidocaína en una concentración de 10^{-5} M y pH 7.0 utilizando tampón fosfato 0.1 M, se observó la aparición de una respuesta anódica en el electrodo de pasta de carbono. En la figura

6.2. se encuentra representado el voltamperograma obtenido con electrodo rotatorio de pasta de carbono por voltamperometría DC y diferencial de pulso, fijando una velocidad de rotación de 200 rpm, una velocidad de barrido de 1.5 mV/s y una amplitud de pulso de +50 mV en el caso de la modalidad de pulso.

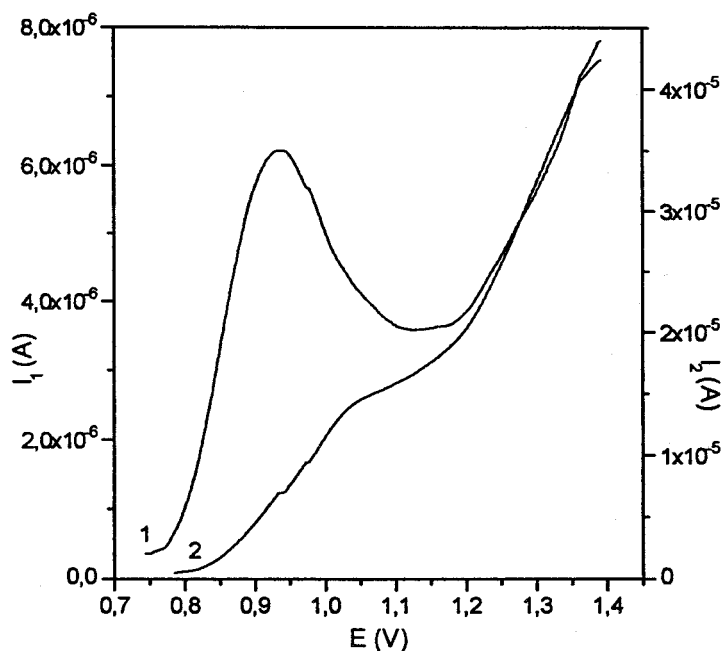


Figura 6.2.
Voltamperogramas diferencial de pulsos (1) y DC (2) sobre el EPC de la lidocaína a pH 7.0.

6.2.1. INFLUENCIA DE LA VELOCIDAD DE ROTACIÓN DEL ELECTRODO DE PASTA DE CARBONO.

Se prepararon muestras de lidocaína de concentración 10^{-5} M y pH 7.0 utilizando tampón fosfato 0.1 M, en matraces de 25 ml. Estas muestras fueron trasvasadas a una celda polarográfica donde se les pasó nitrógeno durante 10 min. Las condiciones de medida por voltamperometría diferencial de pulso fueron +50 mV como amplitud de pulso y velocidades de rotación que oscilaban entre 0 y 3000 rpm.

En la tabla 6.2.1 se muestran los valores de velocidad de rotación, así como los correspondientes a las intensidades y potenciales de pico para la señal de oxidación de la lidocaína.

Tabla 6.2.1.
Estudio de la influencia de la velocidad de rotación en la señal de oxidación de la lidocaína.

w(rpm)	$I_p(\mu A)$	$E_p(V)$
0	0.126	0.86
500	0.203	0.90
1000	0.242	0.92
1500	0.280	0.92
2000	0.312	0.94
2500	0.330	0.96
3000	0.350	0.96

A medida que aumenta el valor de la velocidad de rotación, la intensidad de pico aumenta y el potencial de pico se desplaza hacia valores más positivos.

En la figura 6.2.1 se representa la intensidad de pico en función de la raíz cuadrada de la velocidad de rotación, observando una variación lineal, como corresponde a un comportamiento típico con este tipo de electrodo, que obedece a la siguiente ecuación:

$$I_p = 0.1183 + 0.0042 w^{1/2}; \quad r=0.996.$$

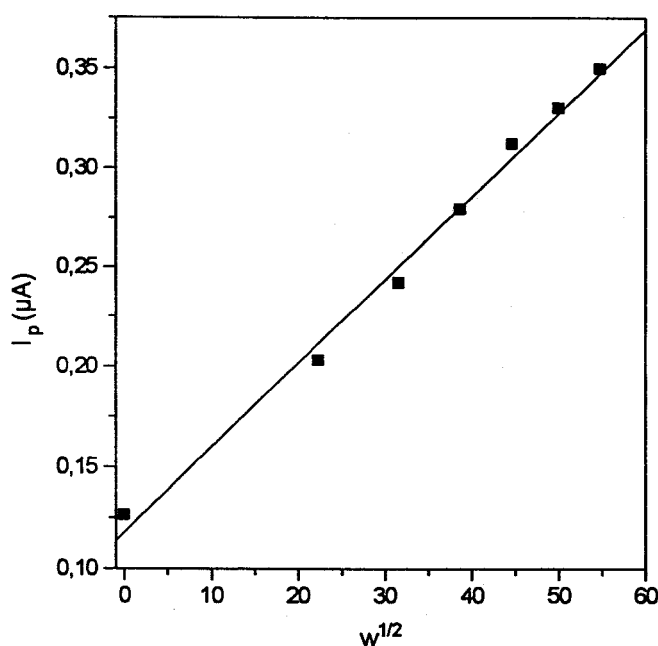


Figura 6.2.1.
Estudio de la influencia de la velocidad de rotación para la señal de oxidación de la lidocaína.

En posteriores estudios la velocidad de rotación utilizada durante la medida de la señal de oxidación es 3000 rpm.

6.2.2. INFLUENCIA DEL pH.

Se prepararon muestras de lidocaína 10^{-4} M, que contenían volúmenes variables hasta un total de 5 ml de ácido fosfórico 0.1 M y hidróxido sódico 0.1 M de forma que siempre se mantenga constante la fuerza iónica, con el fin de ajustar el pH entre los valores 5.0 y 11.0 y agua Milli-Q hasta completar un volumen de 25 ml. Las muestras fueron trasvasadas a la celda polarográfica donde se les pasó nitrógeno durante 10 min. y transcurridos estos, se procedió a la medida de la intensidad del pico de oxidación sobre EPC por voltamperometría diferencial de pulso bajo las siguientes condiciones: velocidad de barrido 5.1 mV/s, amplitud de pulso +50 mV y velocidad de rotación de 3000 rpm.

En la tabla 6.2.2. se recogen los datos obtenidos en esta experiencia y en las figuras 6.2.2.1. y 6.2.2.2. se representan la intensidad de pico y potencial de pico en función del pH, respectivamente.

Tabla 6.2.2.
Estudio de la influencia del pH en la señal de oxidación de la lidocaína.

pH	$I_p(\mu A)$	$E_p(V)$
5.02	1.588	1.07
6.05	2.289	1.00
6.57	3.349	0.95
7.04	4.608	0.91
7.55	3.337	0.89
8.02	3.634	0.85
8.98	3.729	0.82
9.81	2.376	0.82

A la vista de estos resultados elegimos el pH 7.0 como el más adecuado ya que a este valor el pico está bien definido y alcanza su máxima altura. Para valores de pH inferiores a 5.0 no se observa prácticamente pico de oxidación y por encima de pH 10.0 se confunde con la señal del electrolito soporte (tampón fosfato).

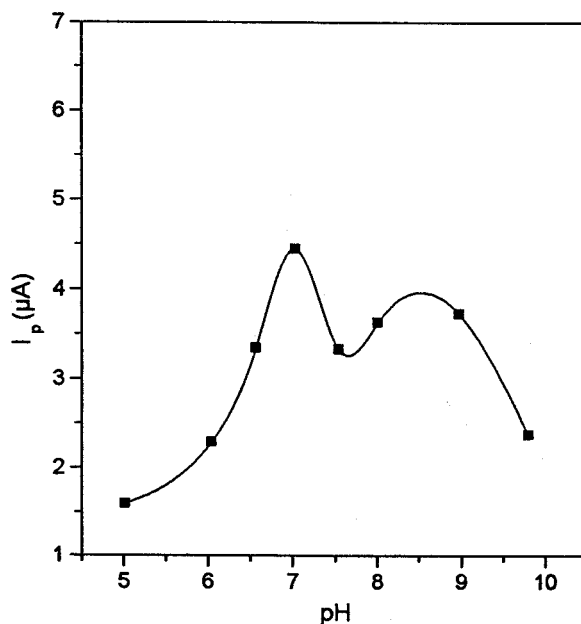


Figura 6.2.2.1.
Estudio de la influencia del pH sobre la señal de oxidación de la lidocaína.
Representación de la intensidad de pico en función del pH.

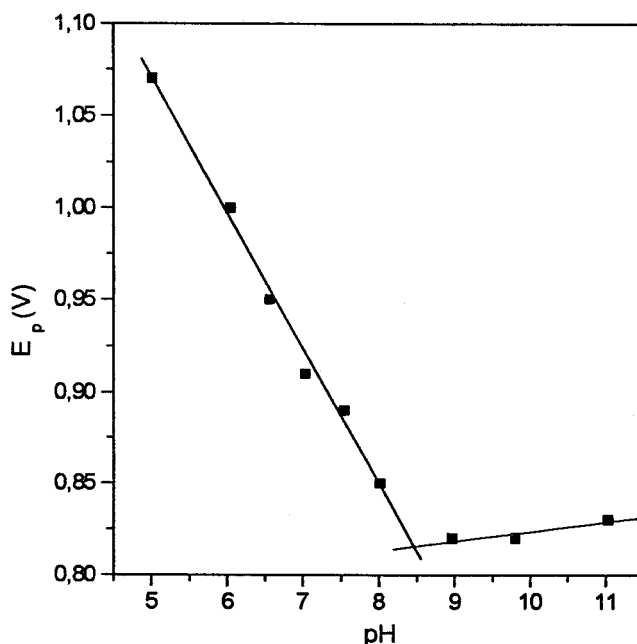


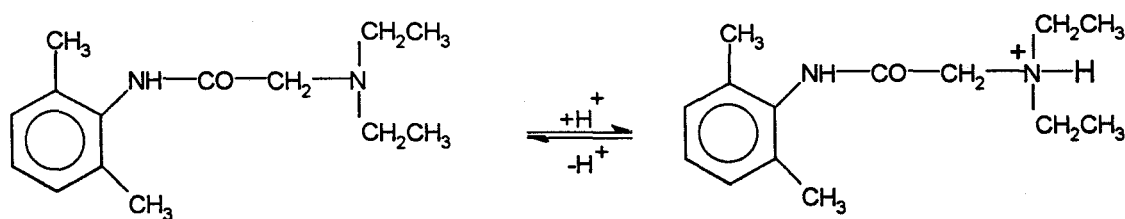
Figura 6.2.2.2.
Estudio de la influencia del pH sobre la señal de oxidación de la lidocaína.
Representación del potencial de pico en función del pH.

En la figura 6.2.2.2. se observa como al representar el potencial de pico en función del pH existen dos tramos lineales. El primer tramo corresponde a un rango de pH entre 5.02 a 8.02 y es dependiente del pH, indicando que los protones intervienen directamente en el proceso de oxidación de la lidocaína sobre el electrodo de pasta de carbono rotatorio. El segundo tramo que corresponde a un rango de pH entre 8.98 y 11.04, es independiente del pH, por lo que los protones no intervienen directamente en el proceso de oxidación.

La ecuación que muestra esta dependencia lineal en el rango de pH comprendido entre 5.02 y 8.02 es la siguiente:

$$E_p = 1.4393 - 0.0737\text{pH}; r=0.996.$$

Esta dependencia lineal indica una protonación sobre el grupo amino que se oxida en el electrodo rotatorio de pasta de carbono.



Se observa también en la figura como ambos tramos lineales se cortan a un valor de pH de 8.46, valor que coincide con el valor del pKa del equilibrio ácido base existente en el rango de pH ya mencionado.

6.2.3. INFLUENCIA DE LA AMPLITUD DE PULSO APLICADO.

Sobre una disolución de lidocaína de 10^{-4} M a pH 7.0 (tampón fosfato 0.1 M) se lleva a cabo el estudio de la influencia de la variación de la amplitud de pulso sobre la intensidad de pico de oxidación manteniendo una velocidad de barrido de 5.1 mV/s y una velocidad de rotación de 3000 rpm.

En la tabla 6.2.3. aparecen los valores de amplitud de pulso aplicado y los valores de intensidad y potencial de pico obtenidos en la señal de oxidación de la lidocaína. En la figura 6.2.3. se representa la variación de la intensidad de pico en función de la amplitud de pulso aplicado. A medida que aumenta la amplitud de pulso la intensidad de pico aumenta, mientras que el potencial de pico disminuye suavemente. En estudios posteriores se mantiene la aplicación de +50 mV como amplitud de pulso, por aportar buena sensibilidad y resolución.

Tabla 6.2.3.
Estudio de la influencia de la amplitud de pulso aplicado sobre la señal de oxidación de la lidocaína sobre el EPC por voltamperometría diferencial de pulso.

ΔE (mV)	I_p (μA)	E_p (V)
10	0.808	0.960
20	1.568	0.957
30	2.558	0.954
40	3.451	0.951
50	4.497	0.945
60	5.542	0.942
70	6.581	0.939
80	7.529	0.936
90	8.784	0.931
100	9.746	0.927
110	10.806	0.922
120	11.782	0.918

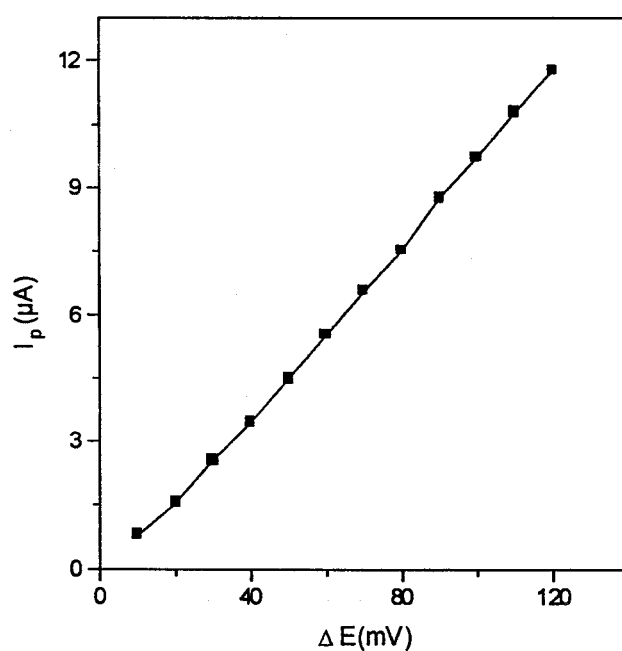


Figura 6.2.3.
Variación de la intensidad de pico frente a la amplitud de pulso sobre el EPC.

6.2.4. INFLUENCIA DE LA VELOCIDAD DE BARRIDO.

Se estudió la influencia de la velocidad de barrido de potencial sobre el pico de oxidación de la lidocaína bajo las siguientes condiciones: lidocaína 10^{-4} M, pH 7.0 (tampón fosfato 0.1 M), velocidad de rotación 3000 rpm y amplitud de pulso +50 mV.

En la tabla 6.2.4. se exponen los valores obtenidos de intensidad y potencial de pico para los distintos valores de velocidad de barrido y en la figura 6.2.4. se representa la intensidad de pico en función de la velocidad de barrido. Se observa que la velocidad de barrido no tiene una gran influencia; la intensidad de pico toma valores crecientes hasta que la velocidad es de 7.0 mV/s y luego a velocidades superiores descende, estando peor definidos los picos. Con respecto a los potenciales de pico, estos se desplazan hacia valores menos positivos y a partir de 10.0 mV/s se estabilizan.

Tabla 6.2.4.
Estudio de la influencia de la velocidad de barrido sobre la oxidación de la lidocaína.

V_{barrido} (mV/s)	I_p (μA)	E_p (V)
1	3.435	0.97
2	3.805	0.97
5	4.325	0.94
7	5.425	0.93
10	5.265	0.94
20	4.915	0.94
30	4.455	0.94

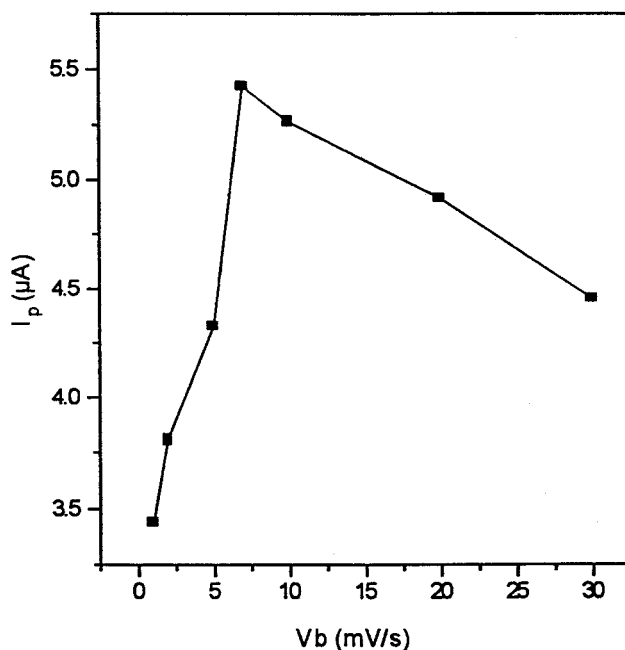


Figura 6.2.4.
Influencia de la velocidad de barrido sobre la intensidad de pico de oxidación de la lidocaína.

6.2.5. INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA.

Para estudiar la influencia de la temperatura se prepararon muestras de igual forma que en apartados anteriores y fueron calculadas sus intensidades a distintos valores de temperatura entre 25 y 60 °C.

En la tabla 6.2.5. se recogen los valores de temperaturas aplicadas e intensidades de pico de la señal de oxidación de la lidocaína y en la figura 6.2.5. se representan estos valores en la que se observa un aumento de la intensidad de pico con la temperatura, calculándose un coeficiente de temperatura de $1.53 \%^{\circ}\text{C}^{-1}$.

Tabla 6.2.5.
Estudio de la influencia de la temperatura aplicada sobre la señal de oxidación de la lidocaína.

T (°C)	log I _p	I _p (μA)
25	0.604	4.023
30	0.614	4.114
35	0.654	4.512
40	0.688	4.8826
45	0.728	5.343
50	0.777	5.987
55	0.814	6.525
60	0.837	6.872

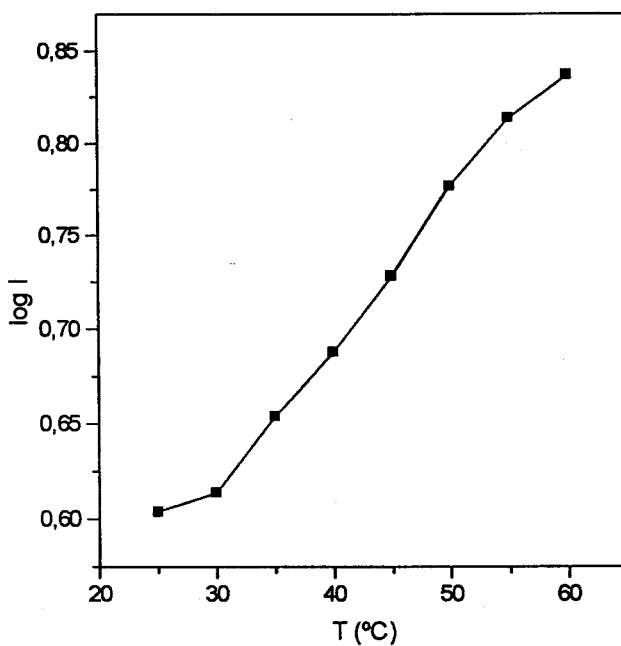


Figura 6.2.5.
Estudio de la influencia de la temperatura sobre la señal de oxidación de la lidocaína. Representación del logaritmo de la intensidad de pico en función de la temperatura aplicada.

6.2.6. ESTUDIO DE LA REVERSIBILIDAD.

El estudio de la reversibilidad del proceso de oxidación de la lidocaína en el EPC se llevó a cabo por voltamperometría DC y voltamperometría cíclica.

6.2.6.1. REVERSIBILIDAD DE LOS PROCESOS POR VOLTAMPEROMETRÍA DC: análisis logarítmico de la función intensidad-potencial y determinación del valor $E_{3/4}-E_{1/4}$.

Para la realización de este estudio se prepararon muestras en matraces de 25 ml conteniendo lidocaína en concentración 10^{-4} M y valores de pH comprendidos entre 5.02 y 11.04.

Los voltamperogramas correspondientes para cada uno de los valores de pH estudiados, fueron registrados bajo las condiciones instrumentales siguientes: velocidad de rotación 3000 rpm y velocidad de barrido 5.1 mV/s.

Se estudió la variación de la función $\log I/I_1 - I$ con el potencial aplicado a cada pH para la señal de oxidación de la lidocaína. En la tabla 6.2.6.1 se recogen los valores de potencial de semionda, intensidad límite, $E_{3/4}-E_{1/4}$ y de $n_a\alpha$ para cada valor de pH.

Tabla 6.2.6.11
Estudio de la reversibilidad de la señal de oxidación de la lidocaína.

pH	$E_{1/2}$ (V)	I_l (μ A)	$E_{3/4}-E_{1/4}$	$n_a\alpha$
5.02	1.003	1.527	0.09	0.861
6.57	0.930	5.211	0.05	1.019
7.04	0.894	10.657	0.08	0.798
7.56	0.873	7.219	0.07	0.918
8.02	0.843	8.560	0.07	0.837
8.98	0.826	9.250	0.07	0.819
9.81	0.789	7.193	0.05	0.918
11.04	0.825	15.395	0.07	0.810
$n_a\alpha$ medio=				0.873 \pm 0.07

De los valores obtenidos de $n_a\alpha$ se deduce que el proceso de oxidación de la lidocaína en el electrodo rotatorio de pasta de carbono es irreversible para cualquiera que sea el valor de n .

Por otra parte, a través de las diferencias existentes entre el $E_{3/4}$ y $E_{1/4}$ para cada valor de pH se confirma el carácter irreversible de la señal de oxidación para cualquier valor de n .

6.2.6.2. REVERSIBILIDAD MEDIANTE VOLTAMPEROMETRÍA CÍCLICA.

Para obtener información que permita elucidar el carácter de los procesos de oxidación de la lidocaína, se estudió la influencia de la velocidad de barrido en voltamperometría cíclica. Se prepararon muestras en matraces de 25 ml que contenían 10^{-4} M en lidocaína a pH 7.0.

En la tabla 6.2.6.2.1. se han recogido los valores de velocidad de barrido e intensidad del pico de oxidación y en la figura 6.2.6.2.1. se representa la intensidad de pico con respecto a la raíz cuadrada de la velocidad de barrido.

Tabla 6.2.6.2.1.
Influencia de la velocidad de barrido sobre la lidocaína por voltamperometría cíclica sobre EPC.

V_b (mV/s)	I_p (μ A)
5	0.744
10	1.167
15	1.458
20	1.606
25	2.075
30	2.344
40	2.654
50	3.054
60	3.439
70	3.780
80	4.116
90	4.443
100	4.650

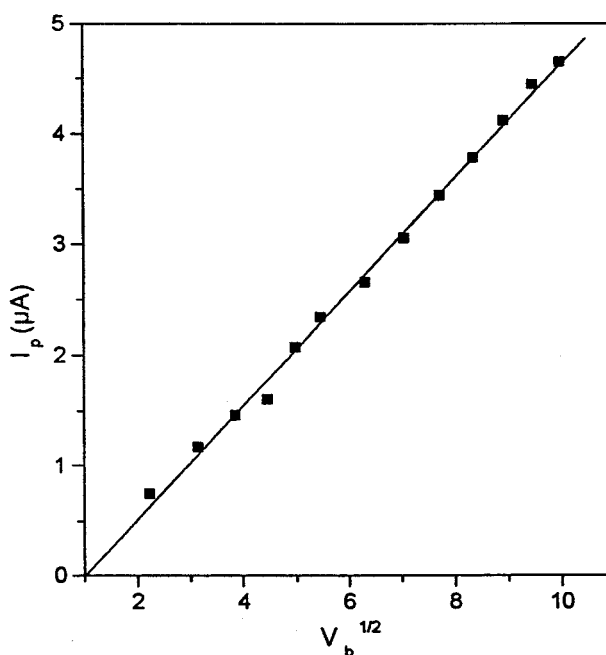


Figura 6.2.6.2.1.

Variación de la intensidad de pico con la raíz cuadrada de la velocidad de barrido.

Se observa la existencia de una relación lineal entre la intensidad del pico de oxidación con la raíz cuadrada de la velocidad de barrido, confirmando, por tanto, el carácter difusivo del proceso de oxidación de este compuesto en el electrodo rotatorio de pasta de carbono.

Esta dependencia lineal viene dada por la siguiente ecuación:

$$I_p = -0.517 + 0.514V_b^{1/2}; r = 0.998.$$

Por otra parte, se confirma la irreversibilidad del proceso de oxidación ya que mediante la técnica de voltamperometría cíclica se obtiene sólo señal de oxidación, sin aparecer en el barrido catódico la correspondiente señal de reducción, tal y como puede observarse en la figura 6.2.6.2.2.

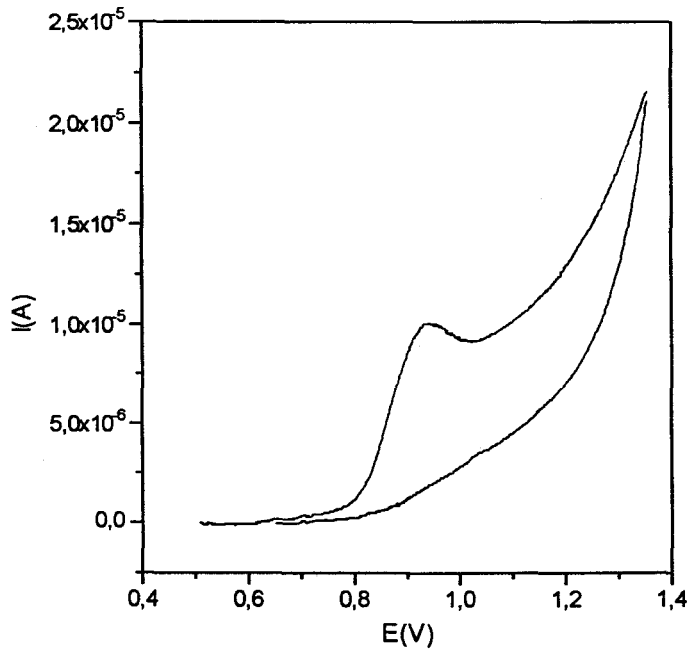


Figura 6.2.6.2.2.
Estudio de la reversibilidad mediante VC. ($V_b=90$ mV/s).

En la tabla 6.2.6.2.2 se encuentran los valores de $n_a\alpha$ correspondientes a oxidación de la lidocaína, calculados a partir de los valores de E_p y $E_{1/2}$.

Tabla 6.2.6.2.2.
Estudio de la reversibilidad mediante VC. Cálculo de los valores de $n_a\alpha$.

V_b (mV/s)	E_p (V)	$E_{1/2}$ (V)	$n_a\alpha$
5	0.878	0.838	1.212
10	0.879	0.839	1.186
15	0.880	0.841	1.222
20	0.884	0.843	1.169
25	0.887	0.846	1.185
30	0.893	0.852	1.183
40	0.899	0.858	1.161
50	0.900	0.859	1.163
60	0.908	0.865	1.106
70	0.909	0.866	1.120
80	0.914	0.873	1.184
90	0.917	0.874	1.117
100	0.914	0.875	1.234
			$n_a\alpha_{\text{medio}} = 1.172 \pm 0.038$

Se observa en la tabla que a medida que aumenta la velocidad de barrido el potencial de pico se desplaza hacia valores más positivos indicando igualmente que se trata de un proceso irreversible.

6.2.7. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN.

Este estudio se llevó a cabo en un rango de concentraciones de 4×10^{-6} a 10^{-3} M en lidocaína a pH 7.0. Se observó linealidad entre la intensidad de pico y la concentración desde 4×10^{-6} M a 10^{-4} M. En la tabla 6.2.7 se encuentran recogidos los valores obtenidos y en la figura 6.2.7 se representan la intensidad de pico en función de la concentración sólo el rango lineal, que responde a la ecuación:

$$I_p = -0.093 + 43705.847C; r=0.998.$$

Tabla 6.2.7.
Estudio de la influencia de la concentración de lidocaína. Velocidad de rotación 3000 rpm, velocidad de barrido 5.1 mV/s y amplitud de pulso de +50 mV.

C (M)	I_p (μ A)
4×10^{-6}	0.122
6×10^{-6}	0.214
8×10^{-6}	0.310
1×10^{-5}	0.398
2×10^{-5}	0.738
4×10^{-5}	1.520
6×10^{-5}	2.710
8×10^{-5}	3.340
1×10^{-4}	4.450
2×10^{-4}	5.870
4×10^{-4}	12.00
6×10^{-4}	16.40
8×10^{-4}	20.07
1×10^{-3}	19.00

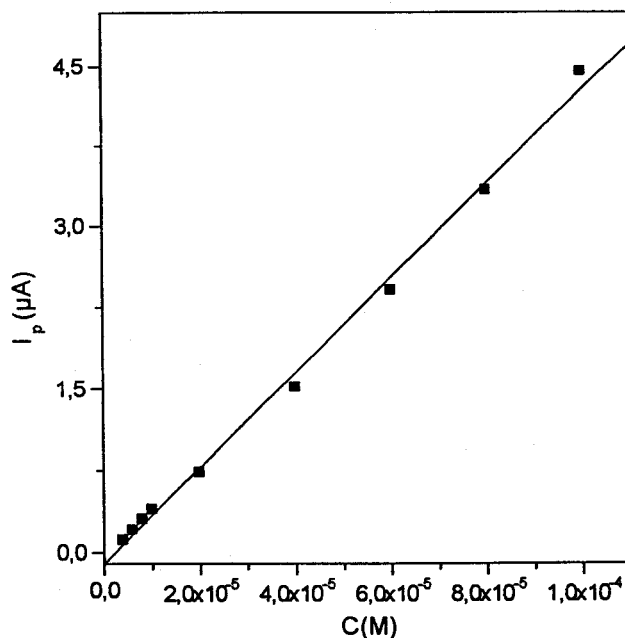


Figura 6.2.7.
Recta de calibrado de la lidocaína por voltamperometría diferencial de pulso sobre EPC. Velocidad de rotación 3000 rpm, velocidad de barrido 5.1 mV/s y amplitud de pulso de +50 mV.

6.2.8. PROCEDIMIENTO RECOMENDADO PARA LA DETERMINACIÓN DE LIDOCAÍNA POR VOLTAMPEROMETRÍA DIFERENCIAL DE PULSO CON ELECTRODO DE PASTA DE CARBONO.

Se toman entre 27.08 y 2.5 µg ml de lidocaína, se añaden 5 ml de tampón fosfato 0.1 M, para ajustar el pH a 7.0 y se enrasa a 25 ml con agua Milli-Q. La muestra es trasvasada a la celda polarográfica, donde se le pasa nitrógeno durante 10 min. y posteriormente se registran los voltamperogramas utilizando las siguientes condiciones operacionales: 3000 rpm como velocidad de rotación; +50 mV como amplitud de pulso y 5 mV/s como velocidad de barrido. A partir de las medidas de intensidad de pico y por comparación con la correspondiente recta de calibrado se determina la concentración de la lidocaína en muestras problema.

6.2.9 REPRODUCIBILIDAD Y SENSIBILIDAD DEL MÉTODO.

De acuerdo con el procedimiento descrito en el apartado anterior se prepararon 9 muestras iguales que contenían lidocaína 10^{-4} M a pH 7.0, y se registraron sus voltamperogramas correspondientes. En la tabla 6.2.9. se recogen los parámetros estadísticos ($\bar{Y}(I_{pr}, \mu A)$; s ; s_m y % E) obtenidos, indicando buena reproducibilidad de las medidas.

$$\bar{y} = \frac{\sum_{i=1}^n y_i}{n} \quad s = \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}{n} \quad s_m = \frac{s}{\sqrt{n}} \quad \%E = \frac{s_m}{\bar{y}} \times 100$$

Tabla 6.2.9.
Reproducibilidad y seguridad del método. Cálculo de parámetros estadísticos.

$\bar{Y}(I_{pr}, \mu A)$	4.41
S	0.091
S_m	0.030
%E	0.7

6.2.10 ESTUDIO DE LOS LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN.

Se prepararon y midieron 9 muestras de lidocaína, según el procedimiento recomendado, cuyas señales resultaron estar comprendidas entre 1 y 30 veces la señal de blanco, efectuando ocho replicados de cada medida (259) obteniéndose los resultados para los límites de detección y cuantificación que se encuentran en la tabla 6.2.10.

Tabla 6.2.10.
Límites de detección y cuantificación, y parámetros de regresión para la determinación de la lidocaína por voltamperometría diferencial de pulsos sobre EPC.

q_0	-0.093
Q_1	43705.27
r	0.998
LOD	9.1×10^{-7} M
LOQ	2.7×10^{-6} M

Comparando estos resultados con los obtenidos a partir del pico de reducción del producto de oxidación, con agua oxigenada, de la lidocaína sobre el electrodo de gotas de mercurio, vemos que utilizando el pico de oxidación sobre el electrodo rotatorio de pasta de carbono se alcanzan, para la determinación de la lidocaína, unos límites de detección y cuantificación del mismo orden, pero presenta la ventaja de no necesitar previas como se requiere en el proceso de reducción

6.2.11. APLICACIONES.

Se ha comprobado la utilidad del método propuesto para la determinación de lidocaína por voltamperometría diferencial de pulso en EPC analizando las mismas preparaciones farmacéuticas que en el capítulo 5. Dos de estas preparaciones son uso oral (Panotile y Otomidrin) y las otras dos son pomadas (Synalar y Proctium).

Tanto Panotili como Otomidrin (que son las preparaciones de uso oral) pueden ser determinadas directamente sin necesidad de realizar extracciones, con lo que, se prepararon muestras de ambas preparaciones tomando una cantidad equivalente de fármaco a 0.542 mg de clorhidrato de lidocaína en un matraz de 25 ml y ajustando el pH a un valor de 7.0 mediante el uso del tampón fosfato 0.1 M.

Synalar y Proctium son pomadas no solubles en medio acuoso con lo que es necesario separar primero el clorhidrato de lidocaína existente en estas pomadas del resto de compuestos que componen dichas formulaciones. Para ello seguimos el método de extracción propuesto en el mencionado apartado del capítulo 5. Una vez preparadas las muestras con clorhidrato de lidocaína extraído de cada una de las pomadas, se toman 2.5 ml de la muestra procedente de Synalar y 12.5 ml de la muestra procedente de Proctium. Se depositan estas cantidades en matraces de 25 ml, ajustándose el pH a un valor de 7.0. En la tabla 6.2.11. se recoge la cantidad de lidocaína que se obtiene según el método empleado en las porciones de fármacos tomados.

Tabla 6.2.11.
Aplicaciones. Resultados para la determinación de lidocaína en distintos fármacos.
Los valores se encuentran expresados en mg/ml (a) y mg/g (b).

Muestra	PPD	HPLC	Valoración potenciométrica
Otomidrin ^a	19.53±0.11	19.58±0.15	
Panotile ^a	39.77±0.17	39.87±0.24	
Synalar ^b	19.78±0.14		19.85±0.43
Proctium ^b			3.94±0.11

Se comparan los resultados obtenidos en Panotile y Otomidrin por voltamperometría diferencial de pulsos y HPLC (farmacopea estadounidense) y Synalar y Proctium por voltamperometría diferencial de pulso y valoración potenciométrica (farmacopea estadounidense), mediante la comparación de las medias obtenidas por ambos métodos, suponiendo como hipótesis nula que las medias no difieren significativamente de cero. Aplicando las ecuaciones expuestas en capítulos anteriores se encuentra un valor de s de 0.21 y 0.13 para Panotile y Otomidrin, respectivamente y de 0.32 para Synalar. Para 4 grados de libertad se tiene un valor de t de 0.41 y 0.47 para Panotile y Otomidrin, respectivamente y de 0.27 para Synalar. El valor crítico de $|t|$ ($\nu=4$, $P=0.05$) es igual a 2.78, valor que es mayor que los valores de t obtenidos para cada muestra, con lo que se acepta la hipótesis nula, es decir, las medias de ambos métodos no difieren significativamente de cero. La comparación de ambos métodos en el fármaco Proctium no ha podido realizarse debido a que no aparece señal en voltamperometría diferencial de pulso.

CAPÍTULO VII
CONCLUSIONES

7.1. Estudio del comportamiento polarográfico y determinación de dibucaína por polarografía diferencial de pulso.

a) Comportamiento electroquímico de la dibucaína.

La dibucaína, en medio ácido, se reduce en el electrodo de gotas de mercurio presentando dos ondas a potenciales de -0.805 V y -1.130 V. La primera onda de reducción corresponde a un proceso controlado por difusión mientras que la segunda es una onda catalítica de hidrógeno. Las reacciones de reducción de este fármaco muestran un comportamiento irreversible. El número de electrones involucrados en el proceso de reducción es 2, en medio ácido y neutro y el número de protones que participan en dicho proceso es igualmente 2, ocurriendo la reducción en el anillo quinolínico.

b) Características del método analítico propuesto y aplicaciones.

La optimización de variables que afectan a la señal de reducción por polarografía diferencial de pulso ha permitido proponer un procedimiento para la determinación de dibucaína en solución hasta una concentración de 10^{-4} M, con un límite de detección de $3.8 \cdot 10^{-7}$ M y un límite de cuantificación de $1.1 \cdot 10^{-6}$ M. El método es bastante selectivo con respecto a un buen número de cationes, compuestos orgánicos y otros anestésicos locales, y su utilidad se ha comprobado, con buenos resultados, en preparaciones farmacéuticas en forma de pomadas (Ultraproct®, Scheriproct® y Ruscus Llorens®) que contienen dibucaína.

7.2. Estudio del comportamiento polarográfico de la nitrosamina de la prilocaína. Determinación de prilocaína por polarografía diferencial de pulso.

a) Comportamiento electroquímico de la prilocaína.

La prilocaína no es electroactiva en el electrodo de gotas de mercurio y para su estudio electroquímico se llevo a cabo una reacción previa de nitrosación sobre el nitrógeno de la amina secundaria. El derivado nitroso de la prilocaína se reduce directamente dando una onda en medio ácido, a un potencial de -0.875 V. Se deduce que la corriente responsable del proceso de reducción es de difusión y las reacciones que tienen lugar muestran comportamiento irreversible. El número de electrones involucrados en el proceso de reducción de este compuesto, en medio ácido y neutro, es 2 y el número de protones que participan en este proceso es igualmente 2, reduciéndose el grupo nitrosamina.

b) Características del método analítico propuesto y aplicaciones.

La optimización de variables que afectan a la onda de reducción por polarografía diferencial de pulso ha permitido proponer un procedimiento para la determinación de prilocaína en solución en un rango de 10^{-6} a 10^{-4} M, siendo el límite de detección de $6.2 \cdot 10^{-7}$ M y el límite de cuantificación de $1.9 \cdot 10^{-6}$ M. Se comprueba la aplicación de este método con buenos resultados en el estudio de interferencias, excepto con clorhidrato de dibucaína y lidocaína en altas proporciones, en la determinación de prilocaína en fármacos y en muestras sintéticas.

7.3. Estudio del comportamiento polarográfico del producto de oxidación de la lidocaína en agua oxigenada. Determinación de lidocaína por polarografía diferencial de pulso.

a) Comportamiento electroquímico de la lidocaína.

La lidocaína no se reduce directamente en el electrodo de gotas de mercurio y para su determinación electroquímica se oxidó con agua oxigenada aprovechando que su estructura posee un nitrógeno de amina terciaria. El derivado oxidado de la lidocaína se reduce en medio ácido dando lugar a una onda a un potencial de -0.5 V. El proceso responsable de esta onda de reducción es de difusión y las reacciones muestran un comportamiento irreversible. El número de electrones involucrados en el proceso de reducción de este compuesto es 2 y el número de protones que participan en el proceso es también 2, reduciéndose el grupo aminoóxido.

b) Características del método analítico propuesto y aplicaciones.

Optimizadas las variables que influyen en la onda de reducción obtenidos por polarografía diferencial de pulso, se propone un procedimiento para la determinación de lidocaína en solución hasta una concentración de $2 \cdot 10^{-4}$ M, con un límite de detección de $1.2 \cdot 10^{-6}$ M y un límite de cuantificación de $3.7 \cdot 10^{-6}$ M. El método presenta un mayor número de interferencias que los anteriores, si bien se ha aplicado, con buenos resultados, en la determinación de lidocaína en preparaciones farmacéuticas de uso tópico (Panotile® y Otomidrin®) y pomadas (Synalar® y Proctium®).

7.4. Estudio de la electrooxidación de la prilocaína en el electrodo de pasta de carbono. Determinación de prilocaína por voltamperometría con EPC estacionario.

a) Comportamiento electroquímico de la prilocaína.

La prilocaína se oxida directamente en el electrodo de pasta de carbono dando una señal de oxidación, en medio básico, a un potencial de 0.87 V. Se deduce que la corriente responsable del proceso de oxidación de la prilocaína es de difusión. Las reacciones de reducción de este fármaco muestran comportamiento irreversible.

b) Características del método analítico propuesto y aplicaciones.

Se propone un procedimiento para la determinación de prilocaína en solución en un rango de 10^{-6} a 10^{-4} M, siendo el límite de detección de $1.7 \cdot 10^{-7}$ M y el límite de cuantificación de $5.2 \cdot 10^{-7}$ M. Se comprueba la aplicación de este método con buenos resultados en la determinación de esta droga en un fármaco y en muestras sintéticas. Comparando estos resultados con los obtenidos a partir del pico de reducción de la nitrosamina derivada de la prilocaína sobre el electrodo sw gotas de mercurio, vemos que utilizando el pico de oxidación sobre EPC se alcanza unos límites de detección y cuantificación más bajos. Por otra parte, la oxidación de la prilocaína sobre el EPC es inmediata y por tanto no se necesita llevar a cabo reacciones previas, como en el caso de la reducción.

7.5. Estudio de la electrooxidación de la lidocaína en el electrodo de pasta de carbono. Determinación de lidocaína por voltamperometría con EPC rotatorio.

a) Comportamiento electroquímico de lidocaína.

La lidocaína se oxida directamente en el electrodo de pasta de carbono dando una onda de oxidación, en medio básico, a un potencial de 0.92 V. Se deduce que la corriente responsable del proceso de oxidación de la lidocaína es de difusión. Las reacciones de reducción de este fármaco muestran comportamiento irreversible.

b) Características del método analítico propuesto y aplicaciones.

Se propone un procedimiento para la determinación de lidocaína en solución en un rango de $4 \cdot 10^{-6}$ a 10^{-4} M, siendo el límite de detección de $9.1 \cdot 10^{-7}$ M y el límite de cuantificación de $2.7 \cdot 10^{-6}$ M. Se comprueba la aplicación de este método con buenos resultados en la determinación de esta droga en distintos fármacos. Comparando estos resultados con los obtenidos a partir del pico de reducción del producto de oxidación, obtenido con agua oxigenada, de la lidocaína sobre el electrodo de gotas de mercurio, vemos que utilizando el pico de oxidación sobre el electrodo rotatorio de pasta de carbono se alcanzan, para la determinación de la lidocaína unos límites de detección y cuantificación del mismo orden, pero presenta la ventaja de no necesitar reacciones previas como ocurre en el proceso de reducción.

CAPÍTULO VIII
BIBLIOGRAFÍA

1. Miescher, K.; *Helv. Chim. Acta*, 15, 163.; 1932
2. Wilson, C. O. and Gisvold; "Textbook of organic, medicinal and pharmaceutical chemistry"; J. B. Lippincott, Philadelphia, 4th ed., 528.; 1962
3. Boyes, R. N., Scott, D. B., Jebson, P. J., Godman, M. J., and Julian, D. G.; Pharmacokinetics of lidocaine in man; *Clin. Pharmacol. Ther.*, 12, 105-116.; 1971
4. Hansson, E.; Absorption, distribution, metabolism and excretion of local anesthetics; In *Local Anesthetics*, Vol. 1. International Encyclopedia of Pharmacology and Therapeutics, Sect. 8 (Lechat, P., ed.) Pergamon Press, Ltd., Oxford, 239-260.; 1971
5. Keenaghan, J. B., and Boyes, R. N.; The tissue distribution, metabolism and excretion of lidocaine in rats, guinea pigs, dogs and man; *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 180, 454-463.; 1972
6. L.G. Chatten, M. Pernarowski, y L.Levi; Identification and determination of some official local anaesthetics as tetraphenylborates; *J. Amer. Pharm. Ass., Sci. Ed.*, 48 (5), 276-283.; 1959
7. H Ellert, y E Sell; Conductimetric titration of local anaesthetics in non-aqueous medium; *Farmacja pol.*, 23 (5-6), 453-455.; 1967
8. Z. Blagojevic, S. Haque y K. Nikolic; Conductimetric determination of anaesthetics compounds; *Acta pharm. Jugosl.*, 17 (2), 123-128.; 1967
9. Olech, Adam; Determination of some local anaesthetics with ammonium reineckate; *Acta Pol. Pharm.*, 28 (2), 175-179.; 1971
10. T. V. Koval'chuk, F. E. Kagan, T. O. Koget; Analysis of medicinal mixtures containing dicain (amethocaine hydrochloride); *Farm. Zh. (Kiev.)*, (2), 73-74.; 1984
11. S. Matejek, K. Vytras, S. Stankova; Determination of alkaloids in collyria by potentiometric titration with electrodes of coated-wire type; *Cesk. Farm.*, 36 (6), 257-260.; 1987
12. I. P. Netesina, V. I. Tkach, L. P. Tsyganok, A. V. Kopytin, Yu. A. Politov; Application of an ion-selective electrode in determination of novovaine (procaine hydrochloride), sovcaïne (cinchocaine hydrochloride) and trimecaine; *Zh. Anal. Khim.*, 47 (4), 710-714.; 1992
13. J. Kostelecka, A. Haller; Determination of proceine an cinchocine in mass-produced and extemporaneous pharmaceuticals by capillary isotachopheresis; *Cesk. Farm.*, 36 (5), 198-200.; 1987
14. K. Igarashi, F. Kasuya, M. Fukui, H. Nanjyou; Determination of dibucaine (cinchocine) and its metabolites in human urine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detector; *Chem. Pharm. Bull.*, 35 (7), 3033-3036.; 1987

15. David, Alkalay, Stephen Carlsen, y William E. Wagner; Quantitation of local anaesthetic dibucaine (cinchocaine) with gas chromatography-mass spectrometry; *Anal. Lett.*, 14(B20), 1745-1756.; 1981
16. K. Igarashi, F. Kasuya, E. Mori, M. Fukui; Determination of dibucaine (cinchocine) in biological samples by chromatography with a nitrogen-phosphorus detector; *J. Chromatogr., Biomed. Appl.* 59 (2(J. Chromatogr., 415)), 407-412.; 1987
17. J. Buechi, V. Lorini, y X. Perlia; Gas-chromatographic investigation on some homologous series of local anaesthetics. II. Work plan, experimental material, procedure and purity; *Pharm. Acta Helv.*, 47 (2-3), 65-74.; 1972
18. M. Kageura, K. Totoki, y Takeaki, Nagata; Gas-chromatographic/mass-spectrometric determination of dibucaine (cinchocine) in biological materials; *Nippon Hoigaku Zasshi*, 32 (4) 188-193.; 1978
19. Joel D. Martucci, y Stephen G. Schulman; Fluorimetric determination of dibucaine (cinchocaine); *Analytica chim. Acta*, 77, 317-319.; 1975
20. J. Büchi y X. Perlia; Relationship between the physical-chemical properties and activity of local anaesthetics. IV. (Determination of cinchocaine and derivatives; *Arzneimittel-Forsch.*, 10 (4), 297-301.; 1960
21. M.A. Korany, A.M. Wahbi, M.A. Elsayed, S. Mandour; Application of first-derivative spectrophotometry to the determination of certain drugs in single-component dosage forms; *Farmaco, Ed. Prat.*, 39 (7), 243-252.; 1984
22. A.G. Saleh, H.F. Askal; Spectrophotometric determination of certain local anaesthetics in pharmaceutical preparations; *Anal. Lett.*, 28 (15), 2663-2671.; 1995
23. Ohno, Noriko, y Sakai, Tadao; Simultaneous spectrophotometric determination of dibucaine (cinchocine) and diphenhydramine using thermochromism of ion associates; *Bunseki Kagaku*, 30 (6), 398-402.; 1981
24. T. Sakai; Simultaneous spectrophotometric determination of dibucaine (cinchocine) and chlorpheniramine maleate in pharmaceuticals using thermochromism of ion associates; *Analyst*, 107 (1275), 640-646.; 1982
25. J.A. Fresen; Thin-layer chromatography of homologous series of local anaesthetics; *Pharm. Weekbl. Ned*, 102 (28), 659-678.; 1967
26. E. Roeder, E. Mutschler y H. Rochemeyer; Use of homogeneous azeotropic mixtures in thin-layer chromatography. IV. Separation of some local anaesthetics; *Pharm. Acta Helv.*, 44 (10), 644-646.; 1969

27. M. Amin, y U. Jakobs; Thin-layer chromatographic separation of several active ingredients from ointments and suppositories and their subsequent direct quantitative analysis by the remission method; *J. Chromatogr.*, 131, 391-398.; 1977
28. J. Turan, S. Matejek, M. Potuzak; Determination of organic bases in infusion preparations and eye-drops; *farm. Obz.*, 58 (12) 551-555.; 1989
29. H. Burghardt; Polarographic determination of some local anaesthetics used in medicine. I. Basic esters of 4-aminobenzoic acid; *Dt. ApothZtg*, 108(32),1151-1153.; 1968
30. K. Shirahama, H. Kamaya, I. Ueda; Ion-selective crown-ether electrodes for local anaesthetic cation; *Anal. Lett.*, 16 (B19), 1485-1494.; 1983
31. E.F. Salim y B. Örtenblad; Qualitative and quantitative test for prilocaïne hydrochloride; *J. Pharm. Sci.*, 56(12), 1645-1646.; 1967
32. J. Hermansson; Direct liquid-chromatographic resolution of racemic drugs using α 1-acid glycoprotein as chiral stationary phase; *J.Chromatogr.* 269(2), 71-80.; 1983
33. P. Erlandsson, I, Marle, L. Hansson, R. Isaksson, C. Pettersson, G. Pettersson; Immobilized cellulase (CBH I) as a chiral stationary phase for direct resolution of enantiomers; *J. Am. Chem: Soc.*, 112(11), 4573-4574.; 1990
34. R. Whelton, P. Dudson, H. Cannell, K. Webster; Determination of prilocaine in human plasma samples using high-performance liquid chromatography with dual-electrode electrochemical detection; *J. Chromatogr., Biomed. Appl.*, 91(1(J. Chromatogr., 526)), 215-222.; 1990
35. M. Siluveru, J. T. Stewart; Stereoselective determinatio of R(-) and S(+) prilocaine in human serum using a brush-type chiral stationary phase, solid-phase extraction and UV; *J. Pharm: Biomed: Anal.*, 15(3), 389-392.; 1996
36. C. Koeppel, J. Tenczer, K.M. Peixoto-Menezes; Formation of formaldehyde adducts from various drugs by use of methanol in a toxicological screening procedure with gas chromatography-mass spectrometry; *J. Chromatogr., Biomed. Appl.* 101 (1(J. Chromatogr., 563)), 73-81.; 1991
37. M. Siluveru, J.T. Stewart; Stereoselective determination of R(-) and S(+) prilocaine in human serum by capillary electrophoresis using a derivatized cyclodextrin and UV detection; *J. Chromatogr., B: Biomed. Appl.*, 693(1), 205-210.; 1997
38. K. Bullock, J. Grundy; Lignocaine hydrochloride and its solutions: purity, test, stability and assay; *J. Pharm. Pharmacol.*, 7 (10), 755-773.; 1955
39. Sakurai Hiroshi, Sahashi Yoshio; Application of non-aqueous titration to drugs. I. Determination of lidocaine (lignocaine) hydrochloride injection; *Ann. Rep. Takamine Lab.*, 8, 127-132.; 1956

40. H.M. Koehler, J.J. Hefferren; Mineral-acid salts of lignocaine; *J. Pharm. Sci.*, 53(9), 1126-1127.; 1964
41. R. Vasiliev, I. Chialda, G. Anastasescu; Determination of lidocaine (lignocaine) in non-aqueous medium in the presence of metanil yellow [C.I. Acid Yellow 36]; *Revta Chim.*, 16(4), 231.; 1965
42. Claudine Lemahieu-Hode, Gerard Lemahieu, Bernard Resibois; Conductimetric titration of salts [of pharmaceutical compounds] in dimethyl sulphoxide; *Annls pharm. fr.*, 30 (11), 755-765.; 1972
43. Istvan Simonyi, Margit Brdiccka; Application of sodium dodecyl sulphate titrimetric solution in the analysis of injection solutions; *Acta pharm. hung.*, 43 (6), 263-268.; 1973
44. G. Tortolani; Determination of amidopyrine, the nicotinate of guaiacyl salicylate and lignocaine hydrochloride by difference potentiometric titration in non-aqueous medium; *Farmaco, Ed. prat.*, 31 (5), 272-277.; 1974
45. Leif Anderson, Anders Graneli, Mats Strandberg; Micro-computer-controlled photometric analyser: application to determination of lignocaine; *Anal. Chim. Acta*, 103 (4), *Comput. Tech. Optimiz.*, 2 (4), 489-494.; 1978
46. Claudine Lemahieu, Bernard Resibois; Determination of hydrochlorides with silver nitrate in dimethyl sulphoxide. Conductimetry. Polarimetric titration. Potentiometry; *Ann. Pharm. Fr.*, 38 (2), 147-154.; 1980
47. Dieter Volkmann; Two-phase titrations with a Mettler DK18 phototitrator. II Titrations with dioctylsulphosuccinate [sodium bis-(2-ethylhexyl)sulphosuccinate] *Git Fachz. lab.*, 26 (2) 113-114.; 1982
48. P.A. Johansson, S. Thelander, O. Stanberg; Automatic potentiometric two-phase titration in pharmaceutical analysis. III. Titrimetric identification of drugs; *Anal. Chim. Acta*, 192 (1), 17-31.; 1987
49. G.X. Li, R. Q. Zheng, W.X. Shi, C.M. Dong; Acid-dye direct titrimetric determination of lignocaine hydrochloride injections; *Yaowu Fenxi Zazhi*, 14 (2), 59.; 1994
50. K. Nikolic, S. Vladimirov, D. Zivanov-Stakic, K. Velasevic; Preparation and coulometric determination of quaternary ammonium iodides of some local anaesthetics; *Acta Pol. Pharm.*, 44 (5), 438-441.; 1987
51. Krystyna Lenartowicz; The thin-layer chromatography of local anaesthetics. I. Separation of lignocaine and its decomposition products; *Farmacja pol.*, 27 (3) 229-234.; 1971
52. A.C. Moffat; Standardisation of thin-layer chromatographic system for the identification of basic drugs; *J. Chromat.*, 110 (2), 341-347.; 1975

53. Simultaneous determination of antiarrhythmia drugs by high-performance thin-layer chromatography; *J. Chromatogr.*, 158, 403-410.; Kwan Yiung Lee, David Nurok, Albert Zlatkis, Arthur Karmen
54. Aly M. Taha, M. A. Abd El-Kader; Selective detection of tertiary N-ethyl drugs on thin-layer chromatograms; *J. Chromatogr.* 177 (2), 405-408.; 1979
55. Jerzy Jarzebinski, Andrzej Baranowski, Irena Hulpowska, Stefania Tonska; Densitometric determination of active components in pharmaceutical preparations. V. Determination of steroid hormones; *Acta Pol. Pharm.*, 36 (4), 457-462.; 1979
56. Dennis Jukotsky, Karl Verbey, S. Joseph Mule; Quantitative differentiation between cocaine, lidocaine (lignocaine) and cocaine-lidocaine mixtures ('rock-cocaine') using thin layer chromatography; *J. Chromatogr.*, 198 (4), 534-535.; 1980
57. Lorenzo Galante, Joseph Bonventre, Henry Salvione, Milton Bastos; Improved detection and identification of basic drugs extracted from tissue using t.l.c.; *J. Anal. Toxicol.*, 6 (5), 262-263.; 1982
58. J. Jarzebinski, M. Ciszewska-Jedrasik; Application of densitometry to determination of active substances in drugs. XII. Determination of active substances in compound preparations containing naphazoline nitrate; *Acta Pol. Pharm.*, 43 (3), 264-269.; 1986
59. M.S. Ionescu, H. Scurei, V. Tamas, A. Voiculescu, G. E. Baiulescu, V.V. Cosofret; Determination of the active principles in new pharmaceutical product by the densitometry method correlated with the technique of electrometrical membrane sensors; *Rev. Chim.*, 38 (12), 1138-1142.; 1987
60. L. Zivanovic, D. Zivanov-Stakic, D. Radulovic; Determination of lignocaine in pharmaceutical preparations using thin-layer chromatographic densitometry; *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 6 (6-8), 809-812.; 1988
61. P. Xu, L. Zheng, C. Hai; Quantitative determination of a mixture of three local anesthetic drugs by TLC scanning; *Zhongguo Yiyao Gongye Zazhi*, 22 (5), 218-219.; 1991
62. Per-Olof Lagerstrom. Bengt-Arne Persson; Liquid chromatography in the monitoring of plasma levels of antiarrhythmic drugs; *J. Chromatog.*, 149, 331-340.; 1978
63. Per Helboe, Mogens Thomsen; Single-dose determination of suppositories containing phenylephrine, lidocaine [lignocaine] and betamethasone valerate by reversed-phase ion-pair liquid chromatography; *Int. J. Pharm.*, 2 (5-6), 317-324.; 1979
64. A.N. Masoud, G.A. Scratchley, S.J. Stohs, D.W. Wingard; Simultaneous determination of lidocaine [lignocaine] and thiopentone in plasma using high-pressure liquid chromatography; *J. Liq. Chromatogr.*, 1 (5), 607-616.; 1978

65. Prem K. Narang, William G. Crouthamel, Nathan H. Carliner, Michael L. Fisher; Lidocaine [lignocaine] and its active metabolites; *Clin. Pharmacol. Ther.*, 24 (6), 654-662.; 1978
66. M. Caude, Le Xuan Phan; Analysis of pharmaceuticals combined in various formulations by high-performance liquid chromatography; *Chromatographia*, 9 (1), 20-29.; 1976
67. Reginald F. Adams, Frank L. Vandemark, G. Schmidt; Simultaneous determination of lidocaine [lignocaine] and procainamide in serum by use of high-pressure liquid chromatography; *Clin. Chim. Acta*, 69 (3), 515-524.; 1976
68. Roger L. Nation, Geoffrey W. Peng, Win L. Chiou; High-performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of lignocaine and its N-Dealkylated metabolites in plasma; *J. Chromatogr.*, 162 (3), *Biomed. Appl.*, 4 (3), 466-473.; 1979
69. J.L. Wisnicki, W.P. Tong, D.B. Ludlum; Analysis of lidocaine [lignocaine] and its dealkylated metabolites by high-pressure liquid chromatography; *Clin. Chim. Acta*, 93 (2), 279-282.; 1979
70. C.P. Leung; High-performance liquid-chromatographic analysis of lignocaine hydrochloride formulations; *J. Chromatogr.*, 178 (2), 579-582.; 1979
71. Jeremy Hill, Andre Roussin, Jacques Leloir, Gilles Caille; The high-pressure liquid-chromatographic determination of lidocaine [lignocaine] and its active de-esthlyated metabolites; *J. Pharm. Sci.*, 69 (11), 1341-1343.; 1980
72. James G. Flood, George N. Bowers, Robert B. McComb; Simultaneous liquid-chromatographic determination of three antiarrhythmic drugs: disopyramide, lidocaine [lignocaine] and quinidine.; *Clin. Chem.*, 26 (2), 197-200.; 1980
73. F. Maurice Smith, Noel O. Nuessle; High-performance liquid chromatographic method for determination of lignocaine in admixture with dextrose injection; *Anal. Lett.*, Part B, 14 (8), 567-575.; 1981
74. Pokar M. Kabra, Su-Hwa Chen, Laurence J. Marton; Liquid-chromatographic determination of antidysrhythmic drugs: procainamide, lignocaine, quinidine, disopyramide and propranolol; *Ther. Drug Monit.*, 3, 91-101.; 1981
75. Sigmund M. Waraszkiewicz, E.A. Milano, R. DiRubio; Stability-indicating high-performance liquid-chromatographic analysis of lidocaine [lignocaine] hydrochloride and lidocaine hydrochloride with epinephrine [adrenaline] injectable solutions; *J. Pharm. Sci.*, 70 (11), 1215-1218.; 1981
76. C.A. Neff-Davis, J.C. Wilcke, L.E. Davis; Rapid analytical procedure for determination of concentrations of lidocaine [lignocaine] and its two active metabolites in canine serum; *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, 5 (4), 289-292.; 1982

77. R. Lindberg, J.S. Salonen, E. Laurikainen; Improved liquid-chromatographic determination of lidocaine [lignocaine] and its de-ethylated metabolites in serum; *Clin. Chem.*, 29 (8), 1572-1573.; 1983
78. F.T. Noggle, C.R. Clark; Liquid-chromatographic analysis of samples containing cocaine, local anaesthetics and other amines; *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 66 (1), 151-157.; 1983
79. M.K. Halbert, R.P. Baldwin; Determination of lignocaine and active metabolites in blood serum by liquid chromatography with electrochemical detection; *J. Chromatogr.*, 306, 269-277.; 1984
80. K. Kushida, K. Oka, T. Suganuma, T. Ishizaki; Simultaneous determination of lignocaine and its principal metabolites by liquid chromatography on silica gel, with aqueous eluent; *Clin. Chem.* 30 (5), 637-640.; 1984
81. C.B. Swezey, J.L. Ponzio; Liquid-chromatographic determination of lidocaine [lignocaine] in serum; *Clin. Biochem.*, 17 (4), 230-232.; 1984
82. F.A. Luzzi, T.L. Wenger, J.K. Klinger, A. Barchowsky, H.C. Strauss; Simultaneous determination of lignocaine and its metabolites in plasma and myocardium; *J. Chromatogr., Biomed. Appl.*, 36 (2 (J. Chromatogr., 311)), 291-299.; 1984
83. L.J. Duse, L.P. Hackett; Simultaneous determination of lidocaine [lignocaine], mexiletine, disopyramide and quinidine in plasma by high-performance liquid chromatography; *J. Anal. Toxicol.*, 9 (2), 67-70.; 1985
84. R. Kawai, S. Fujita, T. Suzuki; Simultaneous quantitation of lidocaine [lignocaine] and its four metabolites by high-performance liquid chromatography: application to studies on in vitro and in vivo metabolism of lidocaine in rats; *J. Pharm. Sci.*, 74 (11), 1219-1224.; 1985
85. T.G. Hurdley, R.M. Smith, R. Gill, A.C. Moffat; Study of the HPLC separation of some local anaesthetics; *Anal. Proc.* 23 (85), 161-163.; 1986
86. R.M. Smith, T.G. Hurdley, R. Gill, A.C. Moffat; Application of retention indices based on the alkyl aryl ketone scale to the separation of the local anaesthetic drugs by high-performance liquid chromatography; *J. Chromatogr.*, 355 (1), 75-85.; 1986
87. H.R. Angelo, J. Bonde, J.P. Kampmann, J. Kastrup; HPLC method for the simultaneous determination of disopyramide, lidocaine [lignocaine] and their monodealkylated metabolites; *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 46 (7), 623-627.; 1986
88. T. Annesley, K. Matz, R. Davenport, D. Giacherio; High-performance liquid-chromatographic assay for tocainide with alternate application for the determination of lidocaine [lignocaine], procainamide and N-acetylprocainamide; *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, 51 (2), 173-181.; 1986

89. H. Murakita, M. Hayashi, H. Mikami, Y. Ishida; Determination of drugs in serum by high-performance liquid chromatography with automated sample preparation; *Bunseki Kagaku*, 35 (3), 236-240.; 1986
90. H.F. Proelss, T.B. Townsend; Simultaneous liquid-chromatographic determination of five antiarrhythmic drugs and their major active metabolites in serum; *Clin. Chem.*, 32 (7), 1311-1317.; 1986
91. N. Daoud, T. Arvidsson, K.G. Wahlund; Determination of lidocaine [lignocaine] and its metabolites by a direct injection LC method using large sample volumes of untreated plasma; *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 5 (6), 533-542.; 1987
92. Y.K. Tam, S.R. Tawfik, J. Ke, R.T. Coutts, M.R. Gray, D.G. Wyse; High-performance liquid chromatography of lidocaine and nine of its metabolites in human plasma and urine; *J. Chromatogr., Biomed. Appl.*, 67 (J. Chromatogr., 423), 199-206.; 1987
93. S.C. Monkman, S. Rosevear, D.W. Holt; Concentrations of lignocaine in foetal tissue following chorionic villus sampling: development and initial evaluation of a sensitive HPLC assay; *Ann. Clin. Biochem.*, 25 (suppl.), 113s-114s.; 1988
94. S.C. Monkman, R. Armstrong, R.J. Flanagan, D.W. Holt, R. Rosevear; High-performance liquid-chromatographic measurement of lignocaine in tissue samples following transabdominal placental biopsy; *Biomed. Chromatogr.*, 3 (2), 88-91.; 1989
95. K. Fukushima, K. Uchida; Determination of lidocaine [lignocaine]; *Nippon Shika Masui Gakkai Zasshi*, 17 (2), 398-401.; 1989
96. L. Wu, Y. Wang; Simultaneous determination of lidocaine [lignocaine] and its metabolite (MEGX), mexiletine, disopyrimide and quinidine in serum by HPLC; *Clin. Chem.*, 35 (7), 1355.; 1989
97. A. Sintov, R. Siden, R.J. Levy; Sensitive high-performance liquid-chromatographic assay using 9-fluorenylmethylchloroformate for monitoring controlled-release lidocaine [lignocaine] in plasma; *J. Chromatogr. Biomed. Appl.*, 88 (2 (J. Chromatogr., 496)), 335-344.; 1989
98. P.J. Howard, J. Moore; Estimation of lignocaine concentrations in plasma by HPLC; *Chromatogr. Anal.*, (9), 9-10.; 1990
99. Y.K. Tam, J. Ke, R.T. Coutts, D.G. Wyse, M.R. Gray; Quantification of three lidocaine [lignocaine] metabolites and their conjugates; *Pharm. Res.*, 7 (5), 504-507.; 1990
100. A. Benko, K. Kimura; Toxicological analysis of lidocaine [lignocaine] in biological materials by using HPLC; *Forensic Sci. INT.*, 49 (1), 65-73.; 1991

101. High-performance liquid-chromatographic method for the simultaneous determination of monoethylglycinexylidide and lignocaine; *J. Chromatogr. Biomed. Appl.*, 112 (2 (*J. Chromatogr.*, 574)), 361-364.; Y. Chen, J.M. Potter, P.J. Ravenscroft
102. K.Q. Ren, A.M. Huang; Simultaneous determination of mexiletine and lignocaine in plasma by HPLC; *Zhongguo Yiyuan Yaoxue Zazhi*, 12 (5), 211-213. ; 1992
103. I.R. Tebbett, A. Negrusz, A.K. Lase, R.C. Jensen; Column switching technique for the determination of lidocaine [lignocaine] and its metabolites in horse urine; *Chromatographia*, 34 (3-4), 143-145.; 1992
104. Y. Chen, J.M. Potter, P.J. Ravenscroft; Quick, sensitive high-performance liquid chromatography assay for monoethylglycinexylidide and lignocaine in serum/plasma using solid-phase extraction; *Ther. Drug Monit.*, 14 (4), 317-321.; 1992
105. L. ye, G. Li, H. Yu, B. Ye, H. Xue; Determination of lignocaine by reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) in healthy human fluids and fat tissue; *Sepu*, 10 (4), 225-226, 235.; 1992
106. S. Sarre, K. Van Belle, I. Smolders, G. Krieken, Y. Michotte; Use of microdialysis for the determination of plasma protein binding of drugs; *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 10 (10-12), 735-739.; 1992
107. X.Q. Chen, K. Chen, W.S. Hu, W. Yun; High-performance liquid-chromatographic determination of lignocaine and bupivacaine un human plasma; *Sepu*, 11 (6), 371-373.; 1993
108. J.X. Zhou, L.J. Zhang, E.K. Wang; Enhanced amperometric detector for local anaesthetics in liquid chromatography with metal-oxide dispersed glassy-carbon electrodes.; *Electroanalysis*, 5 (4), 295-301.; 1993
109. J.X. Zhou, L.J. Zhang, E.K. Wang; Liquid chromatography of local anaesthetics by amperometric detection; *Fenxi Huaxue*, 21 (9), 1031-1033. ; 1993
110. X.Y. Wang; Simultaneous determination of lignocaine and bupivacaine in human serum by reversed-phase high-performance liquid chromatography; *Fenxi Huaxue*, 22 (6), 644.; 1994
111. Y. Chen, J.M. Potter; High performance liquid chromatography (HPLC) an important technique in the studies of lignocaine and its metabolism; *J. Liq. Chromatogr.* 17 (10), 2273-2289.; 1994
112. H. Satake, M. Yajima, S. Ikeda, S. Kaneshina; Determination of a local anaesthetic, lignocaine, in human whole blood by HPLC; *Bunseki Kagaku*, 43 (10), 799-803.; 1994

113. H. Lotfi, J. Debord, M.F. Dreyfuss, P. Marquet, M. Ben Rhaiem, P. Feiss, G. Lachatre; Simultaneous determination of lidocaine and bupivacaine in human plasma: application to pharmacokinetics; *Ther. Drug Monit.*, 19 (2), 160-164.; 1997
114. O. Atay, F. Oztop; Quantitative determination by using HPLC and GLC methods for cocaine hydrochloride in synthetic binary mixtures with procaine hydrochloride, lidocaine hydrochloride and caffeine; *Anal. Lett.*, 30 (3), 565-584.; 1997
115. J. Vessman, G. Schill; Gas chromatography of high-boiling amines; *Svensk Farm. Tidskr.*, 66 (25), 601-618.; 1962
116. J. Vessman; Gas chromatography of high-boiling amines. II. Determination of amines in low concentration; *Acta pharm. Suec.*, 1 (5), 183-198.; 1964
117. F. Reynolds, A.H. Beckett; Determination of bupivacaine, lignocaine and mepivacaine in human blood; *J. Pharm. Pharmacol.*, 20 (9), 704-708.; 1968
118. A. Cometti, G. Bagnasco, N. Maggi; Gas-liquid chromatographic analysis of multi-component suppository formulations; *J. Pharm. Sci.*, 60 (7), 1074-1078.; 1971
119. John M. Strong, Arthur J. Atkinson; Simultaneous measurement of plasma concentrations of lidocaine [lignocaine] and its de-ethylated metabolite by mass fragmentography; *Analyt. Chem.*, 44 (14), 2287-2290.; 1972
120. V. Tomaskova; Identification of some local anaesthetics by gas chromatography, with use of Kovats retention indices; *Farmaceuticky Obz.*, 41 (7), 309-319.; 1972
121. J.G. Kelly, J. Nimmo, R. Rae, R.G. Shanks, L.F. Prescott; Spectrophotofluorimetric and gas-liquid chromatographic methods for the estimation of mexiletine in plasma and urine; *J. Pharm. Pharmacol.*, 25 (7), 550-553.; 1973
122. L.E. Mather, G.T. Tucker; meperidine [pethidine] and other basic drugs: general method for their determination in plasma; *J. Pharm. Sci.*, 63 (2), 306-307.; 1974
123. M. Spencer, A. Mehta, C. Hetherington; Improved gas-chromatographic determination of lignocaine; *J. Hosp. Pharm.*, 33 (1), 13.; 1975
124. R.L. Nation, E.J. Triggs, M. Selig; Gas-chromatographic method for the quantitative determination of lidocaine [lignocaine] and its metabolite monoethylglycinexilidide [2-ethylamino-2',6'-acetoxilidide] in plasma; *J. Chromatogr.*, 116 (1), 188-193.; 1976
125. T.R. Irgens, W.M. Henderson, W.H. Shelver; Gas-liquid chromatographic analysis of lidocaine [lignocaine] in blood using an alkali-flame ionisation detector; *J. Pharm. Sci.*, 65 (4), 608-610.; 1976
126. H.B. Hucker, S.C. Stauffer; Gas-liquid chromatographic analysis for lidocaine [lignocaine] in plasma using a novel nitrogen-sensitive detector; *J. Pharm. Sci.*, 65 (6), 926-927.; 1976

127. Emiko Naito, Michoko Matsuki, Koki Shimoji; Simple method for gas-chromatographic determination of lidocaine [lignocaine] in tissues; *Anesthesiology*. 47 (11), 466-467.; 1977
128. G. Caille, J. Leloir, Y. Latour, J.G. Besner; Gas-liquid chromatographic determination of lidocaine [lignocaine] in human plasma; *J. pharm. Sci.*, 66 (10), 1383-1385.; 1977
129. M. Vigouroux, G. Montay, N. Benoit, L. Duckert, F. Roquet, M. Reynier; Method for determination of lidocaine [lignocaine] and etidocaine in blood by gas chromatography; *Anesth., Analg., Reanim.*, 35 (6), 1045-1049.; 1978
130. Clifford B. Walberg; Lidocaine [lignocaine] by enzyme immunoassay; *J. Anal. Toxicol.*, 2 (4), 121-123.; 1978
131. M.T. Rosseel, M.G. Bogaert; Determination of lidocaine [lignocaine] and its de-ethylated metabolites in plasma by capillary column gas-liquid chromatography; *J. Chromatogr.*, 154 (1), 99-102.; 1978
132. B.J. Kline, M.F. Martin; Simplified gas-liquid chromatographic assay for lidocaine [lignocaine] in plasma; *J. Pharm. Sci.*, 67 (6), 887-888.; 1978
133. Charles E. Hignite, Christian Tschanz, Janice Steiner, David H. Huffman, Daniel L. Azarnoff; Quantitation of lidocaine [lignocaine] and its de-ethylated metabolites in plasma and urine by gas chromatography-mass fragmentography; *J. Chromatogr.*, 161, 243-249.; 1978
134. Philip J. Palermo, J. Brian Lundberg; Simultaneous programmed-temperature gas-liquid chromatographic assay of phenol, chloroxilenol and lidocaine [lignocaine] hydrochloride in topical antiseptic cream; *J. Pharm. Sci.*, 67 (11), 1627-1629.; 1978
135. Ester Zylber-Katz, Liora Granit, Micha Levy; Gas-liquid chromatographic determination of bupivacaine and lidocaine [lignocaine] in plasma. *Clin. Chem.*, 24 (9), 1573-1575.; 1978
136. B.E. Pape, R. Whiting, K.M. Parker, R. Mitra; Enzyme immunoassay and gas-liquid chromatography compared for determination of lidocaine [lignocaine] in serum; *Clin. Chem.*, 24 (11), 2020-2022.; 1978
137. David W. Holt, Robert J. Flanagan, Angela M. Hayler, Mary Loizou; Simple gas-liquid chromatographic method for the measurement of mexiletine and lignocaine in blood plasma or serum; *J. Chromatogr.*, 169, 295-301.; 1979
138. David W. Holt, Mary Loizou, Richard K.H. Wyse; Gas-liquid chromatographic measurement of lignocaine in small samples of canine myocardium after enzymic digestion; *J. Clin. Pathol.*, 32 (3), 225-228.; 1979

139. Satya P. Jindal, Theresa Lutz, Per Vestergaard; Gas-liquid chromatographic.mass spectrometric determination of lidocaine [lignocaine] in an illicit sample of cocaine; *J. Chromatogr.*, 179 (2), 357-360.; 1979
140. Sumain Jain, A. Johnsron; Measurement of lignocaine at low concnetrations in plasma: comparison of gas-chromatography with enzyme immunoassay; *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 8 (6), 598-599.; 1979
141. R.T. Sane, P.P. Karkhanis, P.G. Anaokar; Gas-chromatographic determination of lignocaine in pharmaceuticals; *Indian J. Pharm. Sci.*, 42 (5), 143-144.; 1980
142. B. Mandrou, S. Soebito-Saleh, S. Brun; Gas-chromatographic determination of pheniramine, its derivatives and associated active ingredients in various pharmaceutical formulations; *Labo-Pharma-Probl. Tech.*, 28 (300), 546-551.; 1980
143. J.R. Sharman; OV-225 as stationary phase for determination of anticonvulsants, mexiletine, barbiturates and acetaminophen [paracetamol]; *J. Anal. Toxicol.*, 5 (4), 153-156.; 1981
144. J. Gal, M.D. Freedman, E. Kumar, C.R. Freed; Rapid and simple micro-assay for lignocaine in human blood plasma using gas-liquid chromatography with nitrogen detection; *Ther. Drug Monit.*, 3 (2), 177-180.; 1981
145. Michael E. Kruczek; Rapid gas-liquid chromatographic determination of serum lignocaine using a nitrogen-phosphorus-specific detector; *J. Pharmacol. Methods*, 5 (2), 137-141.; 1981
146. Pai-Chie Chen-Chow, Syvan G. Frank; Determination if lidocaine [lignocaine] and benzocaine in isopropyl myristate; *Int. J. Pharm.*, 8 (2), 81-87.; 1981
147. G. Desch, D. Cavadore, Y. Jullien, L. Mercier, B. Descomps, M. De Rodez; Rapid and simultaneous assay of the main amide-type local anaesthetic agents by gas-liquid chromatography; *Ann. Anaesthesiol. Fr.*, 22 (2), 158-168.; 1981
148. F. E. Karch, K.F. Chmielewski; A g.l.c. assay for lignocaine in human plasma; *J. Pharm. Sci.*, 70 (2), 229-230.; 1981
149. Sthephen D. Gettings, Robert J. Flanagan, David W. Holt; Simple method for measurement of tocinide [2-aminopropiono-2'-6'-xylidide] and lignocaine in blood, plasma or serum using gas liquid chromatography with flame ionisation detection; *J. Chromatogr.*, 225 (2), *Biomed. Appl.*, 14 (2), 469-475.; 1981
150. Darrell R. Abernethy, David J. Greenblatt, Hermann R. Ochs; Lidocaine [lignocaine] determination in human plasma with application to single low-dose pharmacokinetic studies; *J. Chromatogr.*, 232 (1), *Biomed. Appl.*, 21 (1), 180-185.; 1982

151. John D. Hawkins, Robert R. Bridges, Thomas A. Jennison; Single-step assay for lidocaine [lignocaine] and its major metabolite, monoethylglycinexylidide, in plasma by gas-liquid chromatography and nitrogen-phosphorus detection.; *Ther. Drug Monit.*, 4 (1), 103-106.; 1982
152. Arthur T. Kacprowicz; Improved gas-chromatographic determination of lignocaine in plasma; *Clin. Chem.*, 28 (3), 545-546.; 1982
153. H. Breuer; Gas-liquid chromatographic determination of lidocaine [lignocaine] in cat plasma using mepivacaine as internal standard.; *J. Chromatogr.*, 231 (1), *Biomed. Appl.*, 20 (1), 65-72.; 1982
154. Barry Levine, Robert Blanke, James Valentour; Gas-chromatographic analysis of lignocaine in blood and tissues.; *J. Anal. Toxicol.*, 7 (3), 123-124.; 1983
155. Y. Liu, E.C. Griesemer, R.D. Budd, T.T. Noguchi; Determination of lignocaine in post-mortem fluids and tissues.; *J. Chromatogr.*, 268 (29), 329-335.; 1983
156. C.R. Willis, D.J. Greenblatt, D. M. Benjamin, D.R. Abernethy; Simultaneous determination of lignocaine and its de-ethylated metabolites using gas-liquid chromatography with nitrogen-phosphorus detection.; *J. Chromatogr.*, *Biomed Appl.*, 32 (1(*J. Chromatogr.*, 307)), 200-205.; 1984
157. I.B. Comparini, F. Centini, A. Pariali; High-resolution gas-chromatography: simultaneous detection of narcotics, adulterants and diluents in street samples.; *HRC CC, J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.*, 7 (3), 140-141.; 1984
158. Z. Qiao, Y. Tong, G. Li; Gas-chromatographic determination of lignocaine hydrochlorides in blood (serum).; *Yaowu Fenxi Zazhi*, 6 (1), 44-45.; 1986
159. D.E. Coyle, D.D. Denson; Simultaneous measurement of bupivacaine, etidocaine, lidocaine [lignocaine], meperidine [pethidine], mepivacaine and methadone.; *Ther. Drug Monit.*, 8(1), 98-101.; 1986
160. R.T. Coutts, G.A. Torok-Both, Y.K. Tam, L.V. Chu, F.M. Pasutto; Acetylation and pentafluorobenzoylation of lidocaine metabolites in aqueous solution and identification of derivatives by combined gas chromatography-mass spectrometry.; *Biomed. Environ. Mass Spectrom.*, 14 (4), 173-182.; 1987
161. S. Stavchansky, B. Eghbali, R. Geary; Stability-indicating assay of lidocaine [lignocaine] hydrochloride in solution.; *Anal. Lett.*, 20 (5), 821-827.; 1987
162. G. Karlaganis, J. Bircher; Bioavailability determination of lidocaine [lignocaine] by capillary gas-chromatography- ammonia chemical-ionization mass spectrometry.; *Biomed Environ. Mass Spectrom.*, 14 (9), 513-516.; 1987

163. R.T. Coutts, G.A. Torok-Both, L.V. Chu, Y.K. Tam, F.M. Pasutto; In vivo metabolism of lidocaine [lignocaine] in the rat. Isolation of urinary metabolites as pentafluorobenzoyl derivatives and their identification by combined gas chromatography-mass spectrometry; *J. Chromatogr., Biomed. Appl.*, 65 (2 (J. Chromatogr., 421)), 267-280.; 1987
164. T. Fujii, H. Jimba, M. Ogura, H. Arimoto, K. Ozaki; Some applications of surface ionization detector gas chromatography.; *Analyst*, 113 (5), 789-792.; 1988
165. B. Vetter, R. Benecke, D. Olthoff; Gas-chromatographic determination of lignocaine in human plasma; *Pharmazie*, 43 (8), 552-553.; 1988
166. P. Banditt, B. Quednow, H. Walther; Gas-chromatographic determination of lignocaine in biological material.; *Zentralbl. Pharm., Pharmakother. Laboratoriumsdiagn.*, 127 (11), 717-719.; 1988
167. C.G. Godoy, E. Marcuse, A. Rodriguez; Simple alternative method for capillary gas-chromatographic determination of lidocaine [lignocaine] in plasma.; *J. High Resolut. Chromatogr.*, 12 (7), 491-493.; 1989
168. H. Arimoto, K. Shiomi, T. Fujii; Determination of lidocaine [lignocaine] in human serum by capillary gas chromatography with surface ionization detection.; *J. High Resolut. Chromatogr.*, 14 (10), 672-675.; 1991
169. A.M. Lorec, B. Bruguerolle, L. Attolini, X. Roucoules; Rapid simultaneous determination of lidocaine, bupivacaine and their two main metabolites using capillary gas-liquid chromatography with nitrogen-phosphorus detector.; *Ther. Drug Monit.*, 16 (6), 592-595.; 1994
170. C. Webster, M. Cooke; Use of microwave-induced plasma atomic-emission detection for the quantification of oxygen containing compounds.; *Anal. Proc.*, 31 (8), 237-240.; 1994
171. M. Franke, C.L. Winek, H.M. Kingston; Extraction of selected drugs from serum using microwave irradiation.; *Forensic Sci. Int.*, 81 (1), 51-59.; 1996
172. P. Demedts, A. Wauters, F. Franck, h. Neels; Simultaneous determination of lidocaine, bupivacaine, and their two main metabolites using gas chromatography and a nitrogen-phosphorus detector, selection of stationary phase and chromatographic conditions. Letter.; *Ther. Drug Monit.*, 18 (2), 208-209.; 1996
173. S.S. Rossi, A.C. Moore, L.R. Hagey, T.L. Yaksh, S.R. Chaplan; An improved method for the measurement of lidocaine and its metabolites in rat plasma.; *Ther. Drug Monit.*, 19 (2), 179-184.; 1997
174. H. Klein; Qualitative and quantitative determination of procaine, lidocaine [lignocaine], and tetracaine [amethocaine] hydrochlorides in drugs by capillary isotachopheresis.; *Arzneim.-Forsch.*, 32 (II) (8), 795-798.; 1982

175. Z.Chmela, J. Cizmarik, Z. Stransky; Zapillary isotachophoresis of some local anaesthetics.; *Pharmazie*, 40 (10), 731-732.; 1985
176. E.G. Feldmann, H.M. Koehler; Colorimetric determination of lidocaine [lignocaine] with cis-aconitic anhydride.; *J. Amer: Pharm. Ass., Sci. De.*, 48 (10), 549-552.; 1959
177. S.A. Ismaiel, D.A. Yassa: L.N. Gad-El-Rub; Spectrophotometric determination of lignocaine in some pharmaceutical preparations using bromocresol gree.; *Pharmazie*, 30 (6), 408.; 1975
178. D.M. Shingbal; Estimation of lidocaine [lignocaine] by complexation.; *Indian Drugs Pharm. Ind.*, 11 (3), 36.37.; 1976
179. ezzat H. Girgis, Soad Mahmoud; Lignocaine determination in pharmaceutical preparations; *Egypt. J. Pharm. Sci.*, 18 (4), 355-366.; 1977
180. E. Vinkler, F. Klivenyi, V.K. Csukonyi; Identification reaction for lignocaine, and a new spectrophotometric determination; *Pharmazie*, 33 (6), 379.; 1978
181. E.H. Girgis, S. Mahmoud; Lidocaine [lignocaine] determination in pharmaceutical preparations.; *Can. J. Pharm. Sci.*, 14 (1), 24-7.; 1979
182. R.T. Sane,U.M. Vaidya,V.G. Nayak, A.Y. Dhamankar, S.K.Joshi, V.J. Doshi, S.V. Sawant, V. B. Malkar, U.R. Pandit, A.Y. Sathe, Swati Jukar, A.D. Nadkarni; Application of three new dyes in extractive photometric determination of fifteen drugs.; *Indian Drugs*, 19 (10), 398-403.; 1982
183. J. Lemli, I. Knockaert; Determination of organic bases in pharmaceutical preparations by use of cobalt thiocyanate.; *Pharm. Weekbl., Sci. Ed.*, 5 (4), 142-144.; 1983
184. H. Li; Determination of lidocaine [lignocaine] in its preparation derivative spectrum.; *Yaoxue Tongbao*, 22 (4), 221-222.; 1987
185. Y. Zhou; Spectrophotometric determination of lignocaine hydrochloride in injections.; *Yaoxue Tongbao*, 22 (6), 360-361.; 1987
186. P. Dubois, J.R. Martinez, P. Levillain; Determination of five components in a pharmaceutical formulation using near-infra-red reflectance spectrophotometry.; *Analyst*, 112 (12), 1675-1679.; 1987
187. M.I. Arufe.Martinez, J.L. Romero-Palanco, J. Gamero-Lucas, M.A. Vizcaya-Rojas; Application of derivative spectrophotometry for the simultaneous determination of cocaine and other local anaesthetics. I. Cocaine-lidocaine [lignocaine] mixtures.; *J. Anal. Toxicol.*, 13 (6), 337-341.; 1989
188. L. Zivanovic, S. Agatonovic, M. Vasiljevic, L. Markovic, I. Nemcova; Spectrophotometric determination of local anaesthetics as triarylmethane dye ion pairs in pure and dosage forms.; *Pharmazie*, 49 (12), 927-928.; 1994

189. A.Cruz, M. Lopez-Rivadulla, A.M. Bermejo, I. Sanchez, P. Fernandez; Sequential second-derivative spectroscopy of cocaine and adulterants in street drug samples. Part I: cocaine, procaine and lidocaine.; *Anal. Lett.*, 27 (14), 2663-2675.; 1994
190. A.V. Pavlova, G.I. Ljutakov, A.N. Zlatinova; Determination of lidocaine hydrochloride in two component mixture by fourth order derivative UV spectrophotometry.; *Anal. Lab.*, 4 (1), 42-46.; 1995
191. James Theron; Fluorimetric determination of epinephrine [adrenaline] in low-dosage injections and in lidocaine [lignocaine] hydrochloride-epinephrine combinations.; *J. Pharm. Sci.*, 62 (4), 669-671.; 1973
192. H. Tarlin, M. Hudson, M. Sahn; Automated fluorimetric analysis of epinephrine [adrenaline] in lidocaine [lignocaine] hydrochloride injection.; *J. Pharm. Sci.*, 65 (10), 1463-1465.; 1976
193. M. Syoyama, T. Sano; Comparison between lumogallion and calcon in ion-pair extraction-fluorimetry and application to determination of tertiary amines.; *Yakugaku Zasshi*, 104 (4), 351-355.; 1984
194. R. Huang, X. Xu; Phosphorimetric analysis of amines [in blood].; *Yaoxue Xuebao*, 22 (4), 284-288.; 1987
195. R. Montero, M. Gallego, M. Valcarcel; Indirect atomic-absorption spectrometric determination of local anaesthetics in pharmaceutical preparations with a flow-injection precipitatin technique.; *Anal. Chim. Acta*, 215 (1-2), 241-248.; 1988
196. C. Nerin, A. Garnica, J. Cacho; Indirect determination of lidocaine [lignocaine] by atomic-absorption spectrophotometry.; *Anal. Lett.*, 24 (10), 1847-1859.; 1991
197. G. Lei, S. Lin, X. Chi; Study of indirect determination of trace clinic anaesthetics by atomic-absorption spectrophotometry.; *Guangpuxue Yu Guangpu Fenxi*, 11 (6), 57-60.; 1991
198. M.A. El-Ries, F.M. Abou Attia, F.M. Abdel-Gawad, S.M. Abu El-Wafa; Preparation and characterization of copper (II)-lignocaine complex. Indirect estimation of lignocaine in farmaceutical preparations by atomic-absorption spectroscopy (AAS).; *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 12 (9), 1209-1213.; 1994
199. G.A. Neville; Applications of proton magnetic resonance spectroscopy to pharmaceuticals. I. Analgesics.; *Can. Spectrosc.*, 14 (3), 44-47.; 1969
200. W.A. Garland, W.F. Trager; Direct (non-chromatographic) quantification of drugs and theirmetabolites from human plasma utilising chemical-ionisation mass spectrometry and stable-isotope labelling: quinidine and lidocaine [lignocaine].; *Biomed. Mass Spectrom.*, 1 (2), 124-129.; 1974

201. S.D. Nelson, W.A. Garland, G.D. Breck, W.F. Trager; Quantification of lidocaine [lignocaine] and several metabolites utilising chemical-ionisation mass spectrometry and stable-isotope labelling.; *J. Pharm. Sci.*, 66 (8), 1180-1190.; 1977
202. T. Fujii, Y. Kurlhara, H. Arimoto, Y. Mitsutsuka; Surface ionization organic mass spectrometry imipramine, desipramine, clomipramine and lidocaine.; *Anal. Chem.*, 66 (11), 1884-1889.; 1994
203. H. Hoffmann; Polarographic determination of tertiary amines as their amine oxides. III. Influence of adsorption on the reduction of amines oxides.; *Arch. Pharm.*, 304 (11), 849-855.; 1971
204. H. Hoffmann; Polarographic determination of tertiary amines as their amine oxides. IV. Determination of individual amines [of pharmaceutical interest].; *Arch. Pharm.*, 305 (4), 254-258.; 1972
205. M.S. Ionescu, A.A. Abrutis, N. Radulescu, G.E. Baiulescu, V.V. Cosofret; Lidocaine [lignocaine]-selective membrane electrodes and their applications in pharmaceutical analysis; *Analyst*, 110 (8), 929-931.; 1985
206. S. Zommer-Urbanska, J. Urbanska; Determination of some cardiac drugs using an ion-selective electrode and a silver electrode.; *Pharmazie*, 40 (6), 419-420.; 1985
207. W.W. Stargel, Charles R. Roe, P.A. Routledge, D.G. Shand; Importance of blood-collection tubes in plasma lignocaine determinations.; *Clin. Chem.*, 25 (4), 617-619.; 1979
208. Dereck P. Lehane, Paul J. Wissert, Paul Menyharth, Arthur L. Levy, Michael A. Kukucka; Enzyme immunoassay for serum lignocaine in antiarrhythmic therapy.; *Clin. Chem.*, 25 (4), 614-616.; 1979
209. Phillip R. Bach, James W. Larsen; Stability of standard curves prepared for EMIT homogeneous enzyme-immunoassay kits stored at room temperature after reconstitution.; *Clin. Chem.*, 26 (5), 652-654.; 1980
210. Brian E. Pape; Antibody selectivity of a quantitative immunochemical assay for serum lignocaine.; *Clin. Chem.* 27 (12), 2032-2034.; 1981
211. Vinod P. Shah, Gene Knapp, Jerome P. Skelly, Bernard E. Cabana; Interference with measurements of certain drugs in plasma by a plasticiser in Vacutainer tubes.; *Clin. Chem.*, 28 (11), 2327-2328.; 1982
212. F. Quattrocchi, H.T. Karnes, J.D. Robinson, L. Hendeles; Effect of serum-separator blood-collection tubes on drug concentrations; *Ther. Drug Monit.*, 5 (3), 359-362.; 1983
213. J.E. Gorsky; EMIT assay curve stability.; *Clin. Chem.*, 29 (9), 1690.; 1983

214. R. Vozeh, R. Hillman, M. Wandell, T. Ludden, L. Sheiner; Computer-assisted drug assay interpretation based on Bayesian estimation of individual pharmacokinetics: application to lidocaine [lignocaine].; *Ther. Drug Monit.*, 7 (1), 66-73.; 1985
215. R.C. Parish, V.P. Gotz, I.M. Lopez, S.H. Curry; Improved EMIT analysis for lidocaine [lignocaine]; *Clin. Chem.*, 31 (11), 1920-1921.; 1985
216. K.V. Ponganis, D.R. Stanski; Factors affecting measurement of lidocaine [lignocaine] protein binding by equilibrium dialysis in human serum.; *J. Pharm. Sci.*, 74 (1), 57-60.; 1985
217. A.J. Sedman, B.A. Molitoris, L.M. Nakata, J. Gal; Therapeutic drug monitoring in patients with chronic renal failure: evaluation of the Abbott TDx drug assay system.; *Am. J. Nephrol.*, 6 (2), 132-134.; 1986
218. J.E. Devine; Assessment of the Corvac blood collection tube for drug specimen processing; *Ther. Drug Monit.*, 8 (2), 241-243.; 1986
219. K. Di Gleria, H.A.O. Hill, C.J. McNeil, M.J. Green; Homogeneous ferrocene-mediated amperometric immunoassay.; *Anal. Chem.*, 58 (6), 1203-1205.; 1986
220. M.J. Green; Electrochemical immunoassays.; *Philos. Trans. R. Soc.*, 316 (1176), 135-142.; 1987
221. E. Bertol, F. Mari, F. Torracca; Comparison of lidocaine [determination] by fluorescence polarization immunoassay, enzyme immunoassay and high-resolution gas chromatography.; *J. Anal. Toxicol.*, 11 (3), 122-124.; 1987
222. L.M. Lopez, A. Sen, J.D. Robinson, R.W. Curry; Effect of new Vacutainer blood collection tubes on plasma lidocaine [lignocaine] concentrations.; *Ther. Drug Monit.*, 9 (4), 439-442.; 1987
223. Y.H. Caplan, B. Levine; Application of the Abbott TDx lignocaine, phenytoin and phenobarbitone assays to post-mortem blood specimens.; *J. Anal. Toxicol.*, 12 (5), 265-267.; 1988
224. R. Popovic y K. Nikolic; Coulometric determination of local anaesthetics; *Acta pharm. Jugosl.*, 17(2) 77-80. ; 1967
225. Zdzislaw Zakrzewski; Application of arensulphonic acids in quantitative analysis. VI: Determination of local anaesthetics; *Farmacja pol.*, 26(10), 819-821.; 1970
226. Zdzislaw Zakrzewski; Identification of benzocaine, procaine hydrochloride, amethocaine hydrochloride, lignocaine hydrochloride and cinchocaine hydrochloride with arensulphonic acids; *Farmacja pol.*, 26(12), 1033-1037.; 1970

227. A.A. Abou-Ouf, M.I. Waslash, M. Rizk, y F. Belal; Evaluation of certain pharmaceuticals with dibromohydantoins. III. Determination of vitamins and local anaesthetics; *J. Drug Res*, 11(1-2), 81-88.; 1979[1981]
228. Kinzo, Nagasawa, Akira, Ogamo, y Mari Sekiguchi; Ion-exchange chromatography of aminoacids and related amines on cellulose sulphate impregnated cellulose thin layers; *Chem. Pharm. Bull.*, 20(5), 1006-1011.; 1972
229. Wanda, Weglowska, y Edmund Szyszko; Descomposition of phenylbutazone in aqueous solutions. I. Chromatographic evaluation of the solutions; *Farmacja pol*, 29(4), 309-312.; 1973
230. G. Guebitz, R. Wintersteiger; Rapid determination of local anaesthetics by high-performance thin-layer chromatography; *Sci. Pharm*, 46(4), 275-280.; 1978
231. N.D. Greenwood, y H.E. Nursten; Gas-chromatographic studies on basic nitrogenous drugs. I. Addition of basic compounds or steam to the carrier gas; *J. Chromat.*, 92(2), 323-333.; 1974
232. M. Culea, N. Palibroda, Z. Moldovan, A.D. Abraham, P.T. Frangopol; Gas-chromatographic study of some local anaesthetics; *Chromatographia*, 28(1-2), 24-26.; 1989
233. Y.X. Hu, F. Liu, Y. Luo; Analysis for local anaesthetics in plasma; *Yaowu Fenxi Zazhi*, 14(6), 7-10.; 1994
234. V. Jokl y V. Sukupová-Kolková; Paper electrophoresis of some local anaesthetics; *Ceskosl. Farm.*, 10(4), 197-199.; 1961
235. M. Fayez, M. El-Tarras, y S. Zeinab ; Analysis of some local anaesthetics by the acid-dye technique ; *Chem., Biomed. Environ. Instrum.*, 1981, 11 (5-6), 411-423.; 1981
236. H. A. Adams, J. Biscopig, K. Ludolf, A. Boergmann, M.B. Bachamann, G. Hempelmann; Quantitative analysis of amide local anaesthetics with high-pressure liquid chromatography and UV detection; *Reg.-Anaesth.*, 12(3), 53-57.; 1989
237. J. Klein, D. Fernandes, M. Gazarian, G. Kent, G. Koren; Simultaneous determination of lidocaine, prilocaine and prilocaine metabolite o-toluidine in plasma by high-performance liquid chromatography; *Chromatogr. B., Biomed. Appl.*, 655(1), 83-88.; 1994
238. G. Svinhufvud, B. Örtengren y S.E. Jacobsson ; Estimation of lidocaine and prilocaine in biological materials by gas chromatography ; *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 17(2), 162-164.; 1965
239. J.D. Cameron; Gas-chromatographic determination of plasma concentrations of some local anaesthetics using a nitrogen detector; *Clinica Chim. Acta*, 56 (3), 307-309.; 1974

240. Akira Asada; Gas-chromatographic determination of local anaesthetics in blood; Osaka City Med. J., 25(2), 91-122.; 1979
241. Yara Araujo Colona Cretella, y Ester de Camargo Fonseca Moraes; Determination of lidocaine, prilocaine or etidocaine in blood by gas chromatography; Rev. Farm. Bioquim. Univ. S. Paulo, 17(2), 253-269.; 1981
242. M. Prat, B. Bruguerolle; Rapid simultaneous gas-liquid chromatographic determination of live local anaesthetic drugs in serum; Clin. Chem., 32(11), 2098.; 1986
243. M. Bjork, K.J. Petterson, G. Osterlof; Capillary gas-chromatographic method for the simultaneous determination of local anaesthetics in plasma samples; J. Chromatogr., Biomed. Appl., 98(J. Chromatogr. 533), 229-234.; 1990
244. J.F. De Freitas; Rapid Spectrophotometric assay of amidetype dental anaesthetic agents; Aust. Dent. J., 22(3), 182-189.; 1977
245. Tom Riley, Arthur Watson; Polarography and other Voltammetric Methods; Analytical Chemistry By Open Learning, Wiley Ed., 131-139. ; 1987
246. Tom Riley, Arthur Watson; Polarography and other Voltammetric Methods; Analytical Chemistry By Open Learning, Wiley Ed., 106-125.; 1987
247. Zuman, Petr; Organic Polarographic Analysis; Pergamon Press Ed., London, 22-25.; 1964
248. Meites, L; Polarographic Techniques. 2^a Ed. ; Interscience Publishers, J. Welley & Sons, Inc., New York; 1965
249. Birke, R. L., Myung-Hoon, K., Strassfeld, M.; Anal. Chem., 53, 852.; 1981
250. Barker. G. C. y Gadner, A. W.; Atomic Energy Research Establishment (G.B.) Aere Harwell C/R 2297; Anal Chem., 4017.; 1961
251. Ferrier, D. R. y Schroeder, R.R.; J. Electroanal. Chem., 45, 343.; 1973
252. Randles, J. E. B; Trans. Faraday Soc., 44, 327.; 1948
253. Sevcik, A.; Collect. Czech. Chem. Commun, 13, 349.; 1948
254. Nicholson, R. S.; J. Am. Chem. Soc., 79, 2539.; 1954
255. Delahay, P.; J. Am. Chem. Soc., 75, 1190.; 1975
256. Koutecký, J. and Von Stackelberg, M.; The Equation for Polarographic Diffusion Currents and Limits of its Validity; in Progress in Polarography (P. Zuman, Y. M. Kolthoff, editors), Vol. 1, p.21, Interscience, New York.; 1962
257. Meites, L.; Advances in Polarographic Instrumentation in the United States; in Progress in Polarography (P. Zuman, Y. M. Kolthoff, editors) Vol.2, p. 515, Interscience, New York.; 1962
258. P.C. Tompkins, C.L.A. Schmidt; Univ. Calif. Publ. Physiol., 8, 237.;1944

259. J. Mocak, A.M. Bond, S. Mitchell, G. Scollary; A Statistical overview of standard (IUPAC and ACS) and new procedures for determining the limits of detection and quantification: Application to voltammetric and stripping techniques.; IUPAC, Pure and Applied Chemistry 69, 297-328.; 1997
260. US Pharmacopeia Formulary, XXII, 419.; 1990
261. J. Davidek, O. Manousek.; Ceskoslov. Farmacie 1, 177.; 1958
262. H. Monien; Z.Anal.Ch. 224, 360; 1967
263. US Pharmacopeia Formulary, 23, 1287-1288.; 1995
264. T. Kubota, K. Nishikida, K. Iwatani, Y Otshi; Electrons-spin resonance and polarographic studies of the anions radicals of heterocyclic amine N-oxides; J. An. Chem. Soc., 90, 5080; 1968.
265. A. H. Beckett, E.E. Essien, W. F. Smyth; A polarographic method for the determination of the N-oxide, N-oxide-sulphoxide and sulphoxide metabolites of chlorpromazine; J. Pharm. Pharmacol., 26, 399; 1974.
266. US Pharmacopeia Formulary, 23, 885-889.; 1995

FQI 1 T/735

* 5 0 1 2 3 5 2 1 8 *



Haver Jan Martin Francisco - Manila
Estado electorales de autoridades locales
distribucion, proteccion y bienestar

liberalmente con la ley

por un momento

26

Abriendo

99