

Optimización del Método Analítico mediante HPLC/UV Operando en Fase Inversa para la Determinación de Ácido Gálico y Ácido Pícrico en Muestras de Origen Pirotécnico

S. García Alonso
R.M. Pérez Pastor



Optimización del Método Analítico
mediante HPLC/UV Operando en Fase
Inversa para la Determinación de Ácido
Gálico y Ácido Pícrico en Muestras de
Origen Pirotécnico

S. García Alonso

R.M. Pérez Pastor

Toda correspondencia en relación con este trabajo debe dirigirse al Servicio de Información y Documentación, Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas, Ciudad Universitaria, 28040-MADRID, ESPAÑA.

Las solicitudes de ejemplares deben dirigirse a este mismo Servicio.

Los descriptores se han seleccionado del Thesauro del DOE para describir las materias que contiene este informe con vistas a su recuperación. La catalogación se ha hecho utilizando el documento DOE/TIC-4602 (Rev. 1) Descriptive Cataloguing On-Line, y la clasificación de acuerdo con el documento DOE/TIC.4584-R7 Subject Categories and Scope publicados por el Office of Scientific and Technical Information del Departamento de Energía de los Estados Unidos.

Se autoriza la reproducción de los resúmenes analíticos que aparecen en esta publicación.

Catálogo general de publicaciones oficiales
<http://www.060.es>

Depósito Legal: M -26385-2011

ISSN: 1135 - 9420

NIPO: 721-13-045-4

Editorial CIEMAT

CLASIFICACIÓN DOE Y DESCRIPTORES

S37

CHROMATOGRAPHIC; GALLIC ACID; PICRIC ACID; PYROTECHNIC DEVICES;
OPTIMIZATION

Optimización del Método Analítico mediante HPLC/UV Operando en Fase Inversa para la Determinación de Ácido Gálico y Ácido Pítrico en Muestras de Origen Pirotécnico

García Alonso, S.; Pérez Pastor, R.M.;

23 pp., 17 figs., 12 tablas, 7 refs.

Resumen:

Se presenta un estudio sobre la optimización y desarrollo de un método cromatográfico para la determinación de ácido gálico y ácido pítrico en muestras de origen pirotécnico. Para ello, se procedió tanto a la optimización de las condiciones analíticas mediante HPLC en fase inversa con detector por ultravioleta, como a las correspondientes a la etapa de extracción durante el tratamiento de un tipo de muestra pirotécnica.

Optimized Analytical Method to Determine Gallic and Picric Acids in Pyrotechnic Samples by Using HPLC/UV (Reverse Phase)

García Alonso, S.; Pérez Pastor, R.M.;

23 pp., 17 figs., 12 tablas, 7 refs.

Abstracts::

A study on the optimization and development of a chromatographic method for the determination of gallic and picric acids in pyrotechnic samples is presented. In order to achieve this, both analytical conditions by HPLC with diode detection and extraction step of a selected sample were studied.

INDICE

1 – INTRODUCCION	3
2 – EXPERIMENTAL	4
2.1 - Equipos y reactivos	4
2.2 - Condiciones cromatográficas	4
2.3 – Tratamiento de las muestras	5
3 – RESULTADOS	5
3.1 – Análisis instrumental. Condiciones cromatográficas	5
3.1.1 - Registro de los espectros UV	5
3.1.2 - Fase móvil	6
3.1.3 - Temperatura de la columna	8
3.1.4 - Calibrado	9
3.2 – Análisis de la muestra. Parámetros de calidad	11
3.2.1 – Selección condiciones óptimas de extracción	11
3.2.2 – Estudio de recuperación. Sesgo proporcional y sesgo constante	16
3.2.3 - Estudio de precisión	19
4 – CONCLUSIONES	20
5 – BIBLIOGRAFIA	21

1 – INTRODUCCION

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) está ampliamente reconocida como la técnica más útil para la determinación de compuestos orgánicos polares en material explosivo, siendo el método aceptado por la Agencia de Protección Medioambiental de los Estados Unidos para aguas y suelos contaminados con este material (1). Como sucede en la mayor parte de las aplicaciones analíticas, para la determinación de compuestos orgánicos en este tipo de matrices tan complejas, la eficacia de recuperación durante la etapa de extracción es crítica si se quieren alcanzar resultados satisfactorios.

Existe una gran variedad de compuestos orgánicos incluidos como componentes de material explosivo y pirotécnico; entre otros, el ácido gálico (ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico) y ácido pícrico (2,4,6-trinitrofenol) se han empleado habitualmente en el pasado, si bien en la actualidad su uso ha quedado restringido y han sido sustituidos por otros compuestos debido a cuestiones sobre mejora en la seguridad de la fabricación de municiones, almacenamiento y empleo. El establecimiento de protocolos analíticos para su determinación no solo contribuye en el conocimiento de la composición pirotécnica sino también en la supervisión y control de fabricación junto con su incidencia en depósitos y entornos medioambientales.

Desde el punto de vista químico, el ácido gálico es susceptible de participar en reacciones dependiendo de parámetros como pH, polaridad y procesos redox (2). Por tanto, el pH y la polaridad del disolvente utilizado para la recuperación de este compuesto deben ser parámetros claves en la eficiencia de extracción. Por una parte, por efecto del pH variará el rendimiento de extracción de la especie más o menos disociada por ser regulador en la partición forma ácida/iónica, de modo que a pH ácidos la forma neutra del analito debería ser más eficientemente extraída. Por otra parte, el carácter polar del disolvente orgánico utilizado tendrá también una importante influencia durante la extracción para recuperar la especie más o menos disociada.

En los métodos de extracción convencionales mediante agitación, los disolventes más utilizados son metanol, agua y acetonitrilo. Dado el carácter hidrofílico de estos compuestos el agua es un buen agente extractante con elevados rendimientos, si bien es también el que más sustancias co-extraídas puede producir y, por tanto, podrían implicar cromatogramas más complejos.

Además, el ácido gálico es susceptible de formar derivados de tipo dímero, formados como productos de oxidación, lo que supondría la transformación de la especie de interés analítica inhibiendo la correcta identificación y cuantificación del compuesto (3, 4). En definitiva, todos estos factores pueden alterar la medida analítica, implicando resultados erróneos y la necesidad de desarrollar y optimizar cuidadosamente los protocolos de análisis.

Respecto al ácido pícrico, la influencia del pH y el carácter polar del disolvente utilizado durante la etapa de extracción también es importante en su determinación analítica. Este compuesto se caracteriza como ácido fuerte, sin color cuando es disuelto en un disolvente orgánico, mientras que su anión picrato presenta un color amarillo intenso. Así, cuando el ácido pícrico se disuelve en diclorometano se genera una disolución sin color característica de la especie solvatada, sin disociar; sin embargo, cuando se disuelve en agua, se forma la especie iónica, picrato, dando lugar a una disolución de color amarillo, con máximo de absorción en UV a 365 nm (5). Los mismos autores emplearon diferentes disolventes polares para la extracción de muestras de suelos (acetona, metanol, isopropanol, acetonitrilo y

agua), encontrando las disoluciones más intensamente coloreadas aquellas que fueron preparadas en acetona y agua.

El objetivo principal de este trabajo ha sido la optimización del método analítico para la determinación de los ácidos pírico y gálico en material pirotécnico. Considerando la influencia que pueden tener los parámetros indicados, se ha planteado aplicar un diseño factorial de 4 factores y 2 variables para llevar a cabo dicha optimización metodológica. En particular, se han investigado como parámetros con mayor influencia en la variación de la respuesta analítica la composición del agente extractante, agua/metanol, en cuanto a presencia o no de medio ácido (% ácido acético) y la masa de alícuota a analizar.

2 – EXPERIMENTAL

2.1 - Equipos y reactivos

- Balanza analítica "Denver Instruments" (± 0.00001 g).
- Cromatógrafo de líquidos Agilent, con inyector automático, módulo de desgasificación, bomba de gradientes cuaternaria y detector de diodos (serie 1200).
- Columna Agilent XD ($5 \mu\text{m}$, $150 \times 4.6\text{mm}$).
- Disolución patrón "Acido Pírico" (PESTANAL, Fluka), con concentración de $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ preparada en acetonitrilo.
- Acido gálico, sólido (Sigma-Aldrich, 99%).
- Acetonitrilo, metanol, calidad HPLC (Carlo Erba).
- Sulfato magnésico (Sigma Aldrich, 99%).
- Cloruro sódico (Sigma Aldrich)
- Tubos roscados de fondo cónico y con capacidad de 5 mL.

2.2 - Condiciones cromatográficas

En base a la escasez bibliográfica sobre métodos de análisis de ácido gálico y ácido pírico en material explosivo, inicialmente se establecieron las condiciones experimentales indicadas por D. Fei (6). Con objeto de optimizar los métodos cromatográficos y alcanzar los mejores rendimientos, se estudió la influencia de los parámetros considerados como más relevantes en la respuesta.

Las condiciones analíticas inicialmente aplicadas fueron las que se indican a continuación:

Acido pírico

Se empleó como fase móvil, Metanol/Acido acético (1%), operando en modo isocrático (55/45) y con $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ de caudal. Se aplicó HPLC con detección por ultravioleta, midiendo a una longitud de onda de 355 nm.

Acido gálico

El análisis cromatográfico se llevó a cabo a $37 \text{ }^\circ\text{C}$, en modo isocrático empleando fase móvil con Metanol/Acido acético (1%), en proporción 10/90 y a un caudal de $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. La detección se realizó mediante ultravioleta-visible aplicando una longitud de onda de 274 nm.

2.3 – Tratamiento de las muestras (6)

Acido pícrico

Alícuotas de aproximadamente 0.5 g de las muestras de explosivos se sometieron a una extracción simple con 3 mL de agua, mediante agitación manual de unos 5 minutos y recuperación del extracto acuoso.

Acido gálico

Alícuotas de aproximadamente 1 g de las muestras de explosivos se sometieron a una extracción con 3 mL de metanol /agua (80/20, HCl 0.15%) en tubos centrífuga de 10 mL y aplicando ultrasonidos durante 20 min. Se realizó una segunda extracción con 3 mL de la mezcla de disolventes.

3 - RESULTADOS

3.1 – Análisis instrumental. Condiciones cromatográficas

3.1.1- Registro de los espectros UV

Acido pícrico

El análisis con adquisición de espectro en UV de una disolución con ácido pícrico en concentración $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ en acetonitrilo, llevó a la obtención del cromatograma con un pico a 3.0 min y un espectro con dos máximos de absorción a 235 y 355 nm (figura 1). Como ya se ha señalado en el apartado de introducción, existe una significativa influencia del pH y carácter polar del disolvente utilizado para la solubilización del ácido pícrico; así, los dos máximos registrados en el espectro ultravioleta-visible deben corresponder a la especie ácida y a la disociada, o iónica (5).

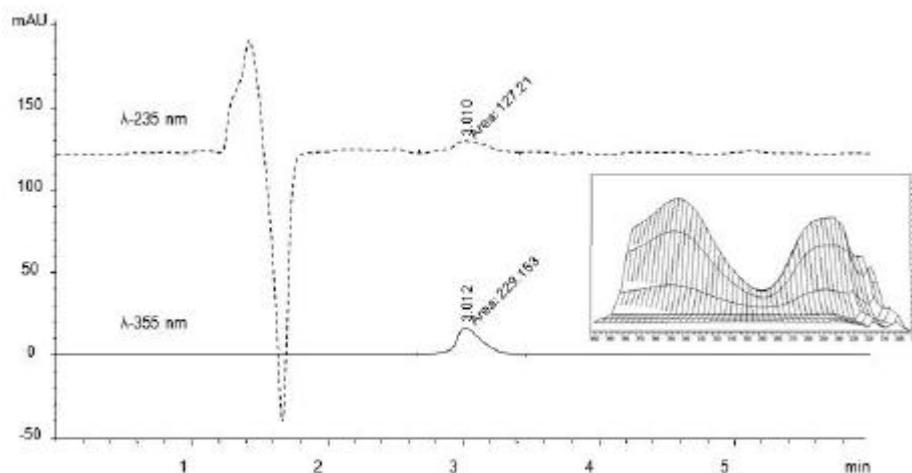


Figura 1 – Cromatogramas registrados tras la medida a las dos longitudes de onda (235 y 355 nm) establecidas como máximos obtenidos en el espectro (ácido pícrico en acetonitrilo $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

Acido gálico

El análisis cromatográfico aplicando las condiciones indicadas en el anterior apartado de una disolución patrón que contenía ácido gálico en concentración 10

$\mu\text{g.mL}^{-1}$ (metanol), llevó a la obtención de un cromatograma con dos picos a 1.55 min y 2.7 min. El registro espectral correspondió con dos máximos a 238 y 274 nm (figura 2).

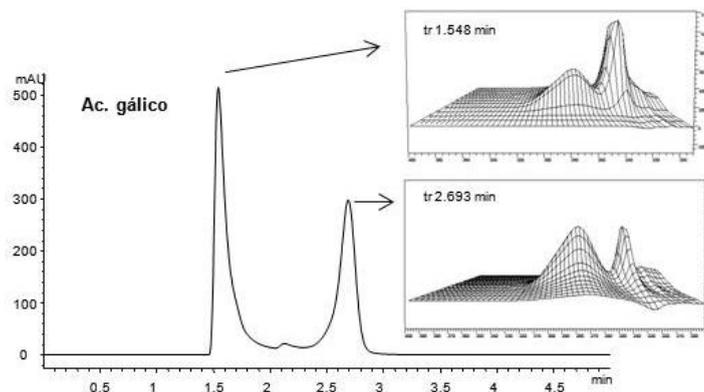


Figura 2 – Cromatograma obtenido con registro de los espectros correspondientes a los dos picos medidos durante el análisis de ácido gálico disuelto en medio metanol y con fase móvil metanol/agua (AcOH, 1%), 20/80.

3.1.2 - Fase móvil

Acido pícrico

Se realizaron ensayos comparativos empleando metanol/agua (AcOH, 1%) y acetonitrilo/agua (AcOH, 1%), en proporción 55/45 (%). Cuando se empleó metanol, se alcanzó una respuesta analítica mayor, con mejor resolución del pico cromatográfico; teniendo en cuenta el carácter menos polar del acetonitrilo, la elución del ácido pícrico de la columna se retrasó en alrededor de medio minuto respecto a la correspondiente medida en metanol (figura 3).

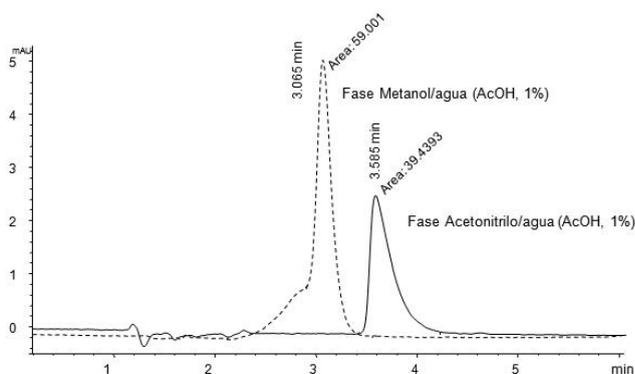


Figura 3 – Influencia de Acetonitrilo (AcN) y metanol (MeOH) como componentes de la fase móvil con una proporción de 55% de fase acuosa (ácido acético, 1%) en el análisis de una disolución acuosa con ácido pícrico ($4 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

Finalmente, se realizaron ensayos comparativos a diferentes proporciones metanol/agua (AcOH, 1%), 65/35, 55/45 y 35/65. Los resultados indicaron mayor retención en la columna cromatográfica, como era de esperar, cuando el contenido de fase acuosa fue más elevado (35/65), por lo que se seleccionó como proporción óptima de trabajo. No se aumentó más el contenido de fase acuosa por llevar implícita un incremento en la presión instrumental.

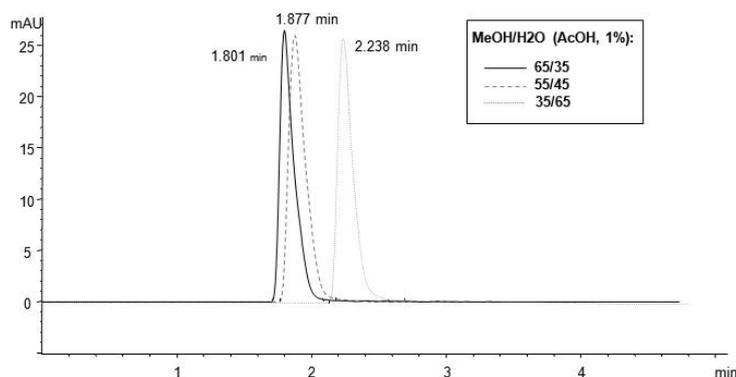


Figura 4 – Influencia de la proporción de Metanol/agua (AcOH, 1%) en el análisis cromatográfico de una disolución acuosa de ácido picrico y empleando columna de 25 cm.

Acido gálico

La influencia del tipo de disolvente utilizado tanto en la fase móvil como en la preparación de la disolución en la medida analítica fue significativa.

En cuanto a la influencia del disolvente empleado para la disolución del analito, se realizaron ensayos empleando acetonitrilo, metanol y agua. Los cromatogramas registrados tras el análisis mediante acetonitrilo/agua (ácido acético 1%), en proporción 20/80 se incluyen en la figura 5:

- Las disoluciones preparadas en acetonitrilo dieron lugar a cromatogramas con un pico medido al menor tiempo de retención (1.530 min).
- Las de metanol correspondieron con cromatogramas con dos picos cromatográficos (1,430 y 1.930 min).
- Las disoluciones patrón de ácido gálico disuelto en agua correspondieron con cromatogramas con un único pico cromatográfico, a 1.950 min.

Considerando la peor solubilización del ácido gálico en acetonitrilo y los bajos tiempos de retención conseguidos, se descartó su uso como disolvente para la preparación de las disoluciones.

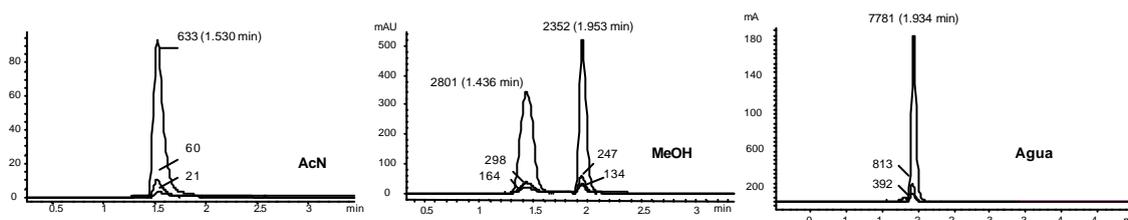


Figura 5 – Cromatogramas obtenidos tras el análisis de disoluciones con distintos niveles de concentración (entre 5 y 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) preparadas en acetonitrilo (AcN), metanol (MeOH) y agua y realizando los análisis cromatográficos en modo isocrático con AcN/agua (AcOH, 1%) (20/80).

Respecto a la influencia de la naturaleza del disolvente orgánico utilizado en la fase móvil, se realizaron ensayos comparativos empleando fases móviles con acetonitrilo/agua (AcOH, 1%) y metanol/agua (AcOH, 1%). La figura 6 incluye los cromatogramas obtenidos tras el análisis de disoluciones de calibrado de ácido gálico, preparadas en medio acuoso y en presencia de ácido acético (1%). La elución con fase metanol/agua (20/80 ácido acético, 1%) se produjo a tiempos de retención más elevados, sin diferencias en cuanto a las áreas medidas. Además, se consideraron ventajas asociadas al empleo de metanol como disolvente como menor coste y toxicidad.

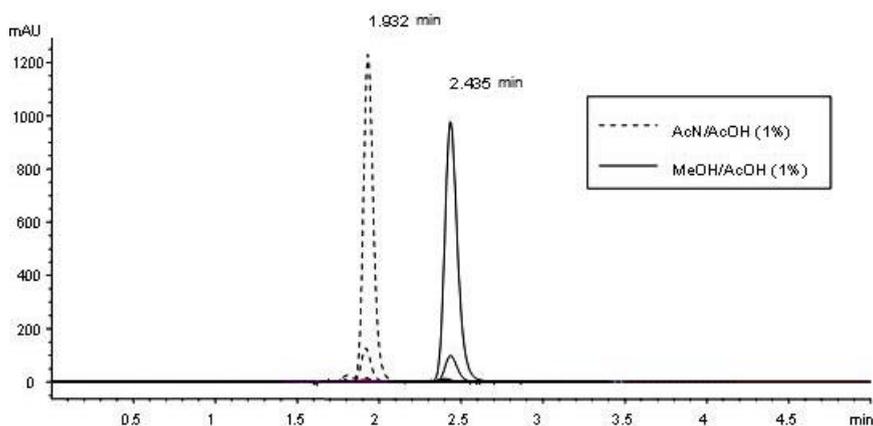


Figura 6 – Cromatogramas registrados tras el análisis de disoluciones patrón preparadas en agua (ácido acético, 1%) empleando como fase móvil acetonitrilo/agua, ácido acético 1% (AcN/AcOH 1%) y metanol/agua, ácido acético 1% (MeOH/AcOH 1%).

Posteriormente, se investigó la influencia de la proporción metanol/agua presente en la disolución de medida. En particular, se llevaron a cabo análisis de una disolución con el analito preparada en mezcla metanol/agua (80/20) y modificando la proporción metanol/agua (AcOH, 1%) en la fase móvil desde 10/90 hasta 50/50. Los resultados indicaron la presencia de dos picos para composiciones de 10/90 metanol/agua (AcOH, 1%) a 1.55 y 3.18 min, reduciéndose esta diferencia conforme se incrementó la proporción de agua (AcOH, 1%) hasta la aparición de un único pico a 1.5 min (figura 8).

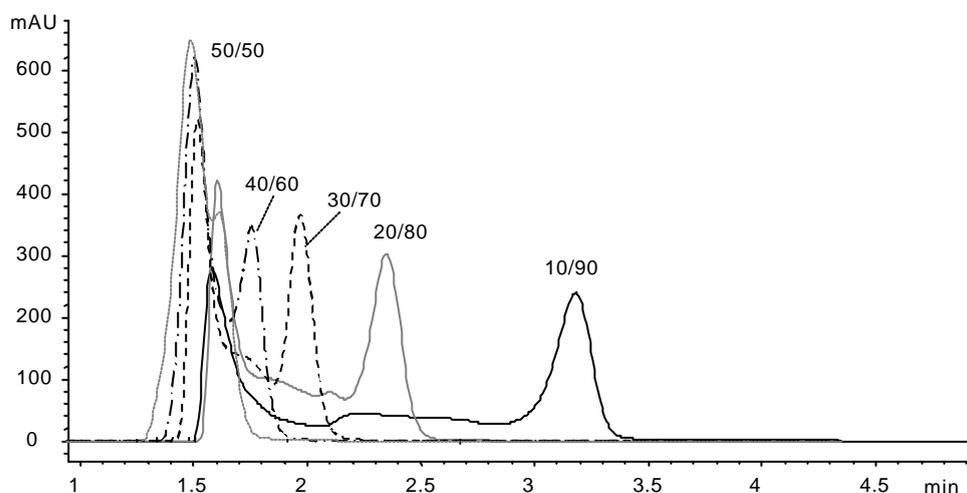


Figura 7 – Variación de los tiempos de retención registrados durante el análisis de ácido gálico conforme se modificó la composición Metanol/Agua (ácido acético, 1%) en la fase móvil, desde 50/50 hasta 10/90 (%) según se indica.

3.1.3 - Temperatura de la columna

Acido pícrico

El efecto de la temperatura de la columna se investigó a 25, 30 y 37 °C (figura 8). No se observó influencia de la temperatura por desplazamiento del tiempo de retención del pico medido aunque sí se observó una deformación del mismo conforme aumentaba la temperatura, así como un aumento en la presión de la columna. Se seleccionó como temperatura óptima 25°C.

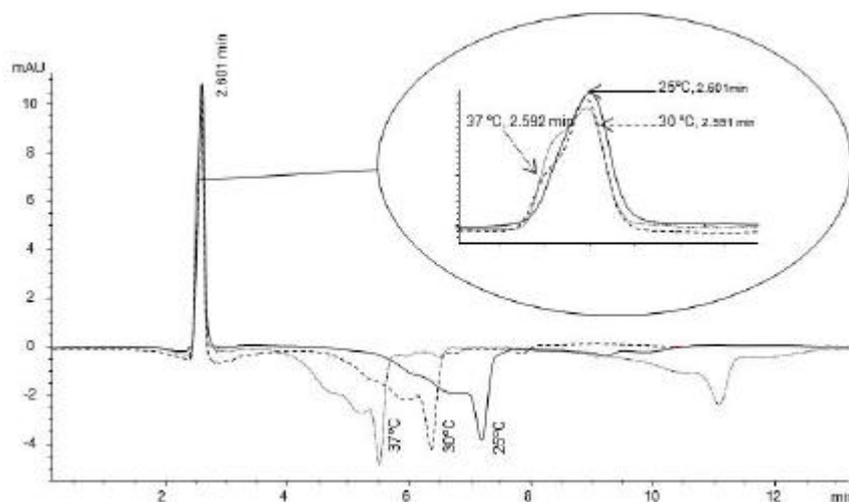


Figura 8 – Variación de los cromatogramas obtenidos tras análisis realizados a 25, 30 y 37 °C, con fase móvil 35/65 (metanol/agua, ácido acético 1%).

Acido gálico

La influencia de la variación de la temperatura aplicada a la columna cromatográfica se estudió tras el análisis de disoluciones patrón de $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ a distintas temperaturas. Como puede observarse en la figura 9, se registró mayores tiempos de retención conforme aumentaba la temperatura.

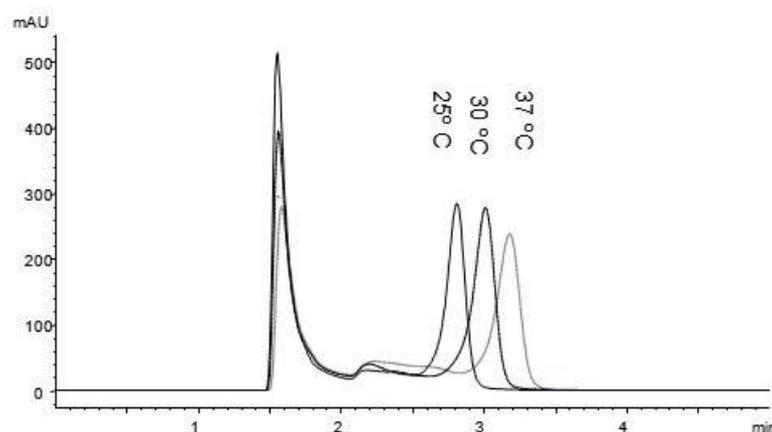


Figura 9 – Influencia de la temperatura de la columna cromatográfica en el análisis cromatográfico del ácido gálico empleando fase móvil metanol/agua (ácido acético, 1%).

3.1.4 - Calibrado

Ac. Pícrico

La linealidad de la respuesta del detector de ultravioleta se investigó a partir de tres disoluciones de calibrado con concentraciones de 0.5, 5 y $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (medio acuoso, ácido acético 1%). Las condiciones experimentales seleccionadas para realizar la medida cromatográfica incluyeron:

- Modo isocrático metanol/agua (ácido acético, 1%), 35/65
- λ UV: 355 nm
- T^a columna cromatográfica: 25°C

La figura 10 corresponde a la curva de calibrado obtenida, estableciéndose una recta: $A = 15.94 \cdot \text{concentración} + 0.7860$ ($r = 0.99998$).

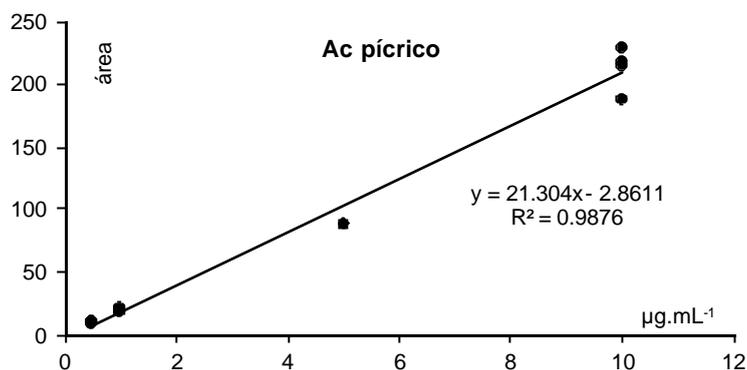


Figura 10 – Curva de calibrado obtenida tras el análisis de disoluciones patrón preparadas entre 0.5 y $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de ácido pícrico en agua.

En cuanto al establecimiento del límite de detección instrumental, se prepararon por dilución en agua (ácido acético, 1%) 3 disoluciones de $0.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (tabla 1) de ácido pícrico. Considerando como límite de detección la concentración correspondiente a tres veces la desviación típica de las áreas medidas, se dedujo un valor de 0.2 ppm.

área	Sd	m	b	I.d. ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
11	1.28	19.6	0.021	0.2
10				
8.46				

Tabla 1 – Deducción del límite de detección instrumental para el análisis de ácido pícrico a partir de disoluciones de calibrado preparadas en agua (0.5 ppm).

La repetitividad de las medidas analíticas se dedujo a partir del análisis de 3 disoluciones de calibrado en concentración de $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$, obteniéndose una desviación típica relativa del 9%.

Acido gálico

Se prepararon disoluciones patrón de ácido gálico en concentración desde 0.2 a $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$, mediante dilución en metanol y llevando a cabo el análisis aplicando las siguientes condiciones cromatográficas:

- Modo gradiente metanol/agua (ácido acético, 1%), según

min	Metanol/Agua, 1% ácido acético (MeOH/AcOH 1%)
0	20/80
3	20/80
10	100/0
12	100/0
15	20/80
20	20/80

- Longitud de onda, UV: 274 nm
- T^a columna cromatográfica: 25°C

La curva de calibrado obtenida se ajustó con buen coeficiente de correlación en el amplio margen de linealidad (fig 11).

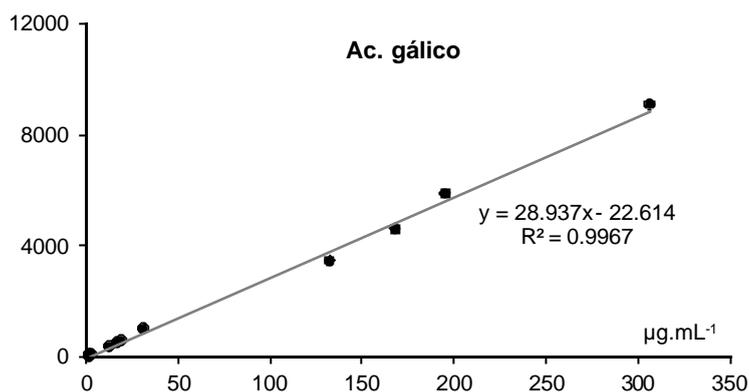


Figura 1 1 – Curva de calibrado obtenida tras el análisis de disoluciones patrón preparadas entre 0.2 y 300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de ácido gálico en metanol.

En cuanto al establecimiento del límite de detección instrumental, se prepararon por dilución en metanol 4 disoluciones de 0.1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (tabla 2). Considerando como límite de detección la concentración correspondiente a tres veces la desviación típica de las áreas medidas, se dedujo un valor de 0.05 ppm como tal.

área	Sd	m	b	I.d. ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
3.09	0.5197	31.879	0.121	0.05
3.67				
3.59				
2.55				

Tabla 2 – Deducción del límite de detección instrumental del análisis de ácido gálico a partir de disoluciones de calibrado preparadas en metanol (0.1 ppm).

La repetitividad de las medidas analíticas se dedujo a partir del análisis de 4 disoluciones de calibrado en concentración de 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, obteniéndose una desviación típica relativa del 7%.

3.2 – Análisis de la muestra. Parámetros de calidad

3.2.1 – Selección de las condiciones óptimas de extracción

Acido pícrico

La optimización de esta etapa se realizó aplicando diseño factorial de 4 factores y dos variables (tabla 3). En particular, se investigó la influencia en la respuesta analítica del peso de alícuota, agente extractante, considerando como tal una disolución acuosa con/sin metanol (%) y pH del mismo (% ácido acético), así como el volumen de dicha disolución de extracción.

Se evaluaron las variaciones de la respuesta analítica frente a pequeñas variaciones de los factores de interés, planteando 16 ensayos y realizando la extracción de alícuotas de material pirotécnico marcados independientemente con ácido pícrico en disolución (tabla 3). Cabe destacar la necesidad de llevar a cabo el marcado del material pirotécnico con disoluciones patrón. La manipulación de este reactivo en estado sólido conlleva riesgo por explosión si no se mantienen condiciones de humedad controlada y su disponibilidad comercial fue bastante difícil.

ensayo	AcOH (%)	MeOH (%)	H ₂ O (mL)	peso aliq (g)	R%
1	0 (-)	0 (-)	1 (-)	0.1 (-)	0 (y ₁)
2	1 (+)	0 (-)	1 (-)	0.1 (-)	78 (y ₂)
3	0 (-)	10 (+)	1 (-)	0.1 (-)	0 (y ₃)
4	1 (+)	10 (+)	1 (-)	0.1 (-)	111(y ₄)
5	0 (-)	0 (-)	2 (+)	0.1 (-)	0 (y ₅)
6	1 (+)	0 (-)	2 (+)	0.1 (-)	62 (y ₆)
7	0 (-)	10 (+)	2 (+)	0.1 (-)	0 (y ₇)
8	1 (+)	10 (+)	2 (+)	0.1 (-)	111(y ₈)
9	0 (-)	0 (-)	1 (-)	0.2 (+)	0 (y ₉)
10	1 (+)	0 (-)	1 (-)	0.2 (+)	46 (y ₁₀)
11	0 (-)	10 (+)	1 (-)	0.2 (+)	0 (y ₁₁)
12	1 (+)	10 (+)	1 (-)	0.2 (+)	104(y ₁₂)
13	0 (-)	0 (-)	2 (+)	0.2 (+)	0 (y ₁₃)
14	1 (+)	0 (-)	2 (+)	0.2 (+)	85 (y ₁₄)
15	0 (-)	10 (+)	2 (+)	0.2 (+)	0 (y ₁₅)
16	1 (+)	10 (+)	2 (+)	0.2 (+)	106(y ₁₆)

Tabla 3 – Plan de experimentación y respuesta analítica de un diseño factorial completo 2⁴. Se indica la matriz de experimentos como dominio experimental (nivel – y +) junto con la anotación de las respuestas medidas (y_n).

Los 16 ensayos se combinaron para obtener 16 tipos de información, tantas como experimentos: el valor medio, cuatro efectos principales, seis efectos de interacción de dos factores, cuatro efectos de interacción de tres factores y un efecto de interacción de cuatro factores (tabla 4).

promedio	$(y_1+y_2+y_3+y_4+y_5+y_6+y_7+y_8+y_9+y_{10}+y_{11}+y_{12}+y_{13}+y_{14}+y_{15}+y_{16})/16$
AcOH(%)	$(-y_1+y_2-y_3+y_4-y_5+y_6-y_7+y_8-y_9+y_{10}-y_{11}+y_{12}-y_{13}+y_{14}-y_{15}+y_{16})/8$
MeOH(%)	$(-y_1-y_2+y_3+y_4-y_5-y_6+y_7+y_8-y_9-y_{10}+y_{11}+y_{12}-y_{13}-y_{14}+y_{15}+y_{16})/8$
H₂O(mL)	$(-y_1-y_2-y_3-y_4+y_5+y_6+y_7+y_8-y_9-y_{10}-y_{11}-y_{12}+y_{13}+y_{14}+y_{15}+y_{16})/8$
Aliq (g)	$(-y_1-y_2-y_3-y_4-y_5-y_6-y_7-y_8+y_9+y_{10}+y_{11}+y_{12}+y_{13}+y_{14}+y_{15}+y_{16})/8$
AcOH/H₂O	$(y_1-y_2-y_3+y_4+y_5-y_6-y_7+y_8-y_9-y_{10}-y_{11}+y_{12}+y_{13}-y_{14}-y_{15}+y_{16})/8$
AcOH/MeOH	$(y_1-y_2+y_3-y_4-y_5+y_6-y_7+y_8+y_9-y_{10}+y_{11}-y_{12}-y_{13}+y_{14}-y_{15}+y_{16})/8$
AcOH/aliq	$(y_1-y_2+y_3-y_4+y_5-y_6+y_7-y_8-y_9+y_{10}-y_{11}+y_{12}-y_{13}+y_{14}-y_{15}+y_{16})/8$
H₂O/MeOH	$(y_1-y_2+y_3-y_4+y_5-y_6+y_7-y_8-y_9+y_{10}-y_{11}+y_{12}-y_{13}+y_{14}-y_{15}+y_{16})/8$
H₂O/aliq	$(y_1+y_2-y_3-y_4+y_5+y_6-y_7-y_8-y_9-y_{10}+y_{11}+y_{12}-y_{13}-y_{14}+y_{15}+y_{16})/8$
MeOH/aliq	$(y_1+y_2+y_3+y_4-y_5-y_6-y_7-y_8-y_9-y_{10}-y_{11}-y_{12}+y_{13}+y_{14}+y_{15}+y_{16})/8$
AcOH/H₂O/MeOH	$(-y_1+y_2+y_3-y_4+y_5-y_6-y_7+y_8-y_9+y_{10}+y_{11}-y_{12}+y_{13}-y_{14}-y_{15}+y_{16})/8$
AcOH/H₂O/aliq	$(-y_1+y_2+y_3-y_4-y_5+y_6+y_7-y_8+y_9-y_{10}-y_{11}+y_{12}+y_{13}-y_{14}-y_{15}+y_{16})/8$
AcOH/MeOH/aliq	$(-y_1+y_2-y_3+y_4-y_5+y_6+y_7-y_8+y_9-y_{10}+y_{11}-y_{12}-y_{13}+y_{14}-y_{15}+y_{16})/8$
H₂O/MeOH/aliq	$(-y_1-y_2+y_3+y_4+y_5+y_6-y_7-y_8+y_9+y_{10}-y_{11}-y_{12}-y_{13}-y_{14}+y_{15}+y_{16})/8$
AcOH/H₂O/MeOH/aliq	$(y_1-y_2-y_3+y_4-y_5+y_6+y_7-y_8-y_9+y_{10}+y_{11}-y_{12}+y_{13}-y_{14}-y_{15}+y_{16})/8$

Tabla 4 – Cálculo de los efectos: contenido en % de ácido acético (AcOH), agua (H₂O), volumen de metanol (MeOH) y peso de alícuota (Aliq).

El efecto principal se calculó como la diferencia entre la respuesta media cuando el factor estuvo en el nivel (+) y en el nivel (-); en principio, cuanto más varía la respuesta, mayor debe ser el efecto principal. Sin embargo, pueden existir compensaciones entre unas respuestas y otras y llevar a interpretaciones erróneas solo a partir de efectos principales. Por ello, es importante considerar si el efecto de un factor varía a distintos niveles de otros factores; es decir, debe investigarse si

existen efectos de interacción, de modo que el efecto de un factor dependa de qué valor tome otro factor (figura 12).

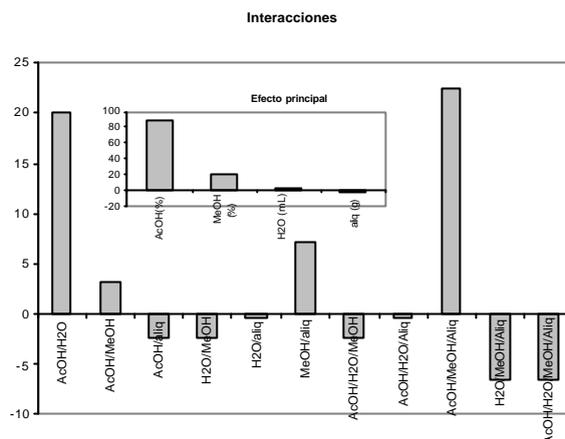


Figura 12 – Representación gráfica de los resultados obtenidos para los efectos investigados como principales e interacciones durante la optimización del método analítico de ácido pícrico.

La primera observación de interés tras los ensayos efectuados fue la ausencia de señal analítica cuando no se añadió al disolvente de extracción ácido acético 1%. Así, los resultados indicaron rendimientos entre 46 y 110 cuando se empleó medio ácido, si bien los valores más elevados, entre 100-110%, se alcanzaron cuando se empleó acético (1%) en presencia de un 10% de metanol. La adición de metanol en un 10% también provocó un incremento en los rendimientos alcanzados, en un 20%.

Respecto a los efectos de interacción, destacaron principalmente los de AcOH/H₂O y AcOH/MeOH/alícuota. Más detalladamente, los gráficos de interacción (figura 13) muestran el cambio en la respuesta al variar cada factor para distintos valores del otro factor. Cuando las líneas son cruzadas indican que existe interacción significativa entre ambos factores y ello ocurre entre los factores de contenido ácido acético y metanol. Sin embargo, cuando las líneas son prácticamente paralelas implican ausencia de interacción entre los factores, caso para el resto de los factores considerados.

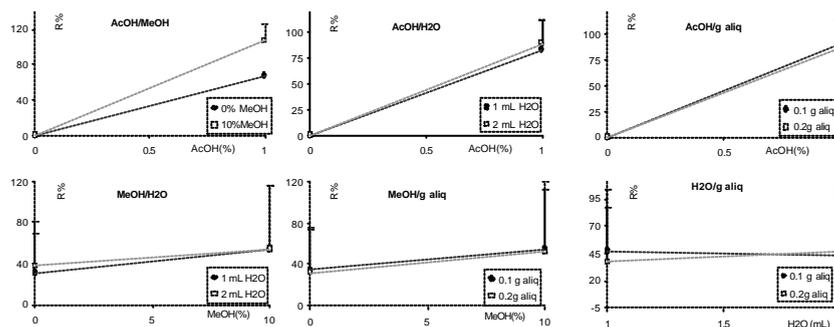


Figura 13 – Gráficos de interacción obtenidos durante estudio analítico ácido pícrico. Líneas paralelas indican que no existe interacción y líneas cruzadas indican interacción importante.

Las condiciones seleccionadas como más adecuadas para la extracción analítica de ácido pícrico en las muestras estudiadas se establecieron como:

- Disolvente de extracción: medio acuoso, con un 10% de metanol y un 1% de ácido acético.
- Volumen de disolvente: 10/1 (mL/g alícuota)
- Peso alícuota: entre 0.1 y 0.25 g.

Transcurridas más de 48 h desde su preparación, el análisis de extractos llevó a la pérdida de señal analítica dejando constancia de la degradación del analito con el tiempo. Por tanto, para evitar reducción de la eficiencia, se estableció como condición el análisis inmediato tras el tratamiento de la muestra.

Acido gálico

Las propiedades químicas del ácido gálico hacen que este compuesto sea susceptible de numerosas transformaciones como oxidaciones provocadas por cambios de pH (3).

El marcado de material pirotécnico se realizó con ácido gálico en estado sólido, ya que en disolución presentaba una elevada tendencia a tener transformaciones químicas inhibiendo la formación de la especie de interés analítico en este trabajo.

La optimización de la etapa de extracción analítica se realizó análogamente al estudio del ácido pícrico, aplicando diseño factorial de 4 factores y dos variables (tabla 5). En particular, se investigó la influencia en la respuesta analítica del peso de alícuota, agente extractante, considerando contenido en agua (H₂O %) y pH del mismo (AcOH %), volumen del disolvente de extracción (MeOH, mL).

La extracción se efectuó sobre alícuotas de material pirotécnico marcados independientemente con ácido gálico en estado sólido.

ensayo	AcOH (%)	H ₂ O (%)	MeOH (mL)	peso aliq (g)	R%
1	0 (-)	0 (-)	1 (-)	0.1 (-)	50 (y ₁)
2	1 (+)	0 (-)	1 (-)	0.1 (-)	73 (y ₂)
3	0 (-)	10 (+)	1 (-)	0.1 (-)	82 (y ₃)
4	1 (+)	10 (+)	1 (-)	0.1 (-)	85 (y ₄)
5	0 (-)	0 (-)	2 (+)	0.1 (-)	70 (y ₅)
6	1 (+)	0 (-)	2 (+)	0.1 (-)	74 (y ₆)
7	0 (-)	10 (+)	2 (+)	0.1 (-)	93 (y ₇)
8	1 (+)	10 (+)	2 (+)	0.1 (-)	88 (y ₈)
9	0 (-)	0 (-)	1 (-)	0.2 (+)	48 (y ₉)
10	1 (+)	0 (-)	1 (-)	0.2 (+)	59 (y ₁₀)
11	0 (-)	10 (+)	1 (-)	0.2 (+)	74 (y ₁₁)
12	1 (+)	10 (+)	1 (-)	0.2 (+)	75 (y ₁₂)
13	0 (-)	0 (-)	2 (+)	0.2 (+)	59 (y ₁₃)
14	1 (+)	0 (-)	2 (+)	0.2 (+)	63 (y ₁₄)
15	0 (-)	10 (+)	2 (+)	0.2 (+)	81 (y ₁₅)
16	1 (+)	10 (+)	2 (+)	0.2 (+)	65 (y ₁₆)

Tabla 5 – Plan de experimentación y respuesta analítica de un diseño factorial completo 2⁴. Se añade la matriz de experimentos como dominio experimental (nivel – y +) junto con la anotación de las respuestas medidas (y_n).

Los resultados obtenidos indicaron más importantes los efectos de interacción entre AcOH/MeOH y AcOH/H₂O (figura 14).

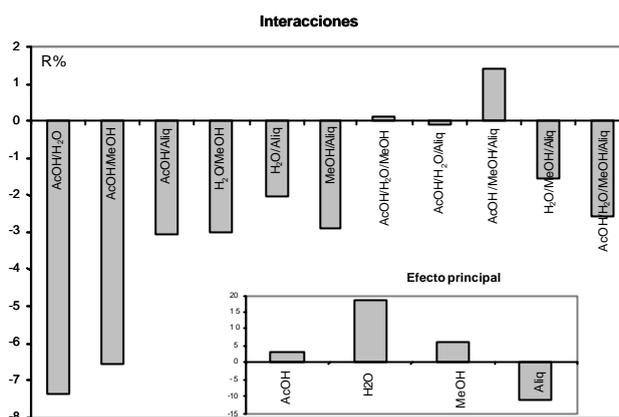


Figura 14 – Representación gráfica de los resultados obtenidos para los efectos investigados como principales e interacciones durante la optimización del método analítico de ácido gálico.

Los gráficos de interacción (figura 15) muestran con más detalle el cambio en la respuesta al variar cada factor para distintos valores del otro factor. Cuando las líneas son prácticamente paralelas (interacción AcOH/Alig, H₂O/Alig, MeOH/Alig y MeOH/H₂O) implican ausencia de interacción, mientras que las líneas cruzadas indican que existe una interacción significativa entre ambos factores (caso para AcOH/H₂O, AcOH/MeOH, H₂O/MeOH).

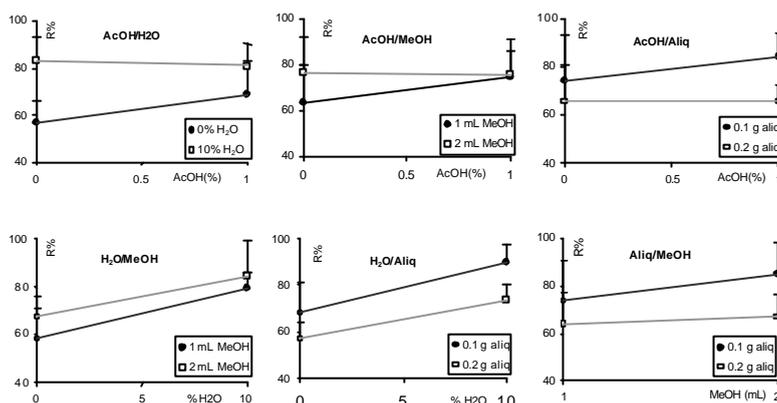


Figura 15 – Gráficos de interacción. Líneas paralelas indican que no existe interacción y líneas cruzadas indican interacción importante.

En definitiva, los resultados indicaron:

- La adición de agua en un 10% al metanol como agente extractante supone incrementos de los rendimientos obtenidos.
- La adición de ácido acético (1%) al metanol como agente extractante lleva a aumentar los rendimientos calculados. En presencia de agua (10%) no se obtienen diferencias significativas respecto a la disolución MeOH/H₂O sin ácido acético. La disolución acidulada sin adición de agua, produce olores característicos de la formación de compuestos azufrados.
- Pequeñas variaciones del peso de alícuotas analizadas no se relacionan con diferencias significativas en los rendimientos obtenidos.

La principal conclusión del estudio por tanto fue la elevada influencia de la proporción de ácido acético y agua presente en el disolvente de extracción para favorecer o no la presencia de la especie de interés analítico. Los resultados indicaron una reducción de la señal analítica en el transcurso de minutos cuando se re-analizaron los extractos obtenidos utilizando MeOH/AcOH y MeOH/H₂O, mientras que la reducción no fue tan importante cuando el agente extractante fue MeOH/H₂O/AcOH. Transcurridas más de 24 h la respuesta analítica de los extractos

obtenidos en MeOH/H₂O se había reducido en un 98 %, mientras que la respuesta para el extracto obtenido en MeOH/AcOH/H₂O solo se había reducido en un 20%. Se observa, por tanto, falta de estabilidad química del analito con el tiempo desde su extracción y la necesidad de analizar prácticamente de manera inmediata a su preparación y seleccionando como mezcla de extracción MeOH/AcOH/H₂O.

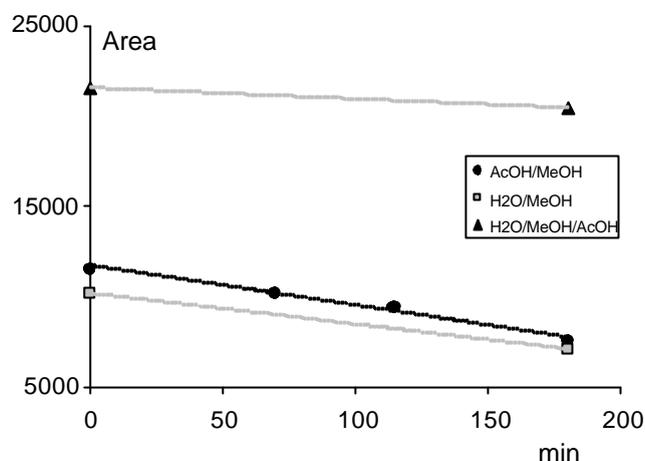


Figura 16 – Variación en la respuesta analítica de uno de los extractos obtenidos en MeOH/AcOH en el transcurso del tiempo (min) desde su preparación.

Las condiciones más adecuadas para el análisis de ácido gálico durante el tratamiento de la muestra de material pirotécnico quedaron establecidas como:

- Disolvente de extracción: H₂O/MeOH (10%)/AcOH (1%)
- Volumen de disolvente (mL): 20*peso alícuota (g)

3.2.2 – Estudio de recuperación. Sesgo proporcional y sesgo constante

Acido pícrico

El estudio de recuperación se planteó mediante marcado de 2 alícuotas de material pirotécnico con volúmenes de disolución patrón de ácido pícrico ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) para generar concentraciones de 44 y $3.9 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. De estas muestras inicialmente preparadas se tomaron sucesivas alícuotas para llevar a cabo los ensayos de recuperación planificados. Así, tras la mezcla mediante agitación manual del vial y reposo durante 24 h, se analizaron por triplicado alícuotas de 0.1, 0.25 y 0.5 g del material marcado, aplicando las condiciones previamente indicadas (tabla 6).

CCa ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	Aliq (g)	CCa ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	CCe ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	R(%)
44.1	0.10	4.41	2.41	0.55
			2.73	0.62
			2.41	0.55
	0.25		3.53	0.80
			3.52	0.80
			3.23	0.73
	0.50		3.04	0.69
			2.89	0.66
			2.87	0.65
3.93	0.10	0.39	0.16	0.40
			0.12	0.31
			0.14	0.36
	0.25		0.33	0.86
			0.36	0.91
			0.30	0.78
	0.50		0.29	0.74
			0.24	0.60
			0.23	0.60

Tabla 6 – Estudio de la reproducibilidad analítica a partir del análisis de muestras de material pirotécnico marcado a distintos niveles de concentración y mediante pesada de alícuotas entre 0.1 y 0.5 g. Se indica CCa como la concentración de referencia o añadida, expresada en $\mu\text{g.mL}^{-1}$ y CCe como la concentración encontrada en $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

La representación de los promedios de recuperación obtenidos (figura 17) muestra las diferencias encontradas en función de la concentración de marcado de las alícuotas de material pirotécnico. Como puede observarse, alícuotas de 0.1 g correspondieron con recuperaciones por debajo incluso del 40% a bajos niveles, quedando descartada su aplicación. El estudio de sesgos se realizó a partir de los resultados obtenidos con las alícuotas de 0.25 y 0.5 g.

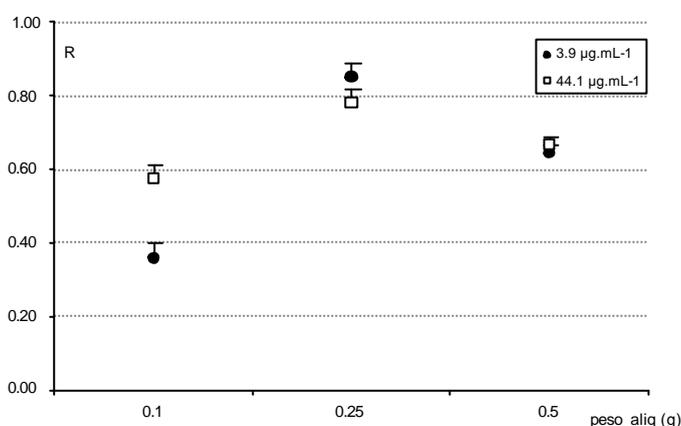


Figura 17 – Representación de los valores promedio de recuperación obtenidos según la alícuota utilizada para realizar el análisis.

En cuanto a la existencia de sesgo proporcional, los rendimientos obtenidos en torno al 70%, indican la necesidad de aplicar un factor de corrección a los resultados analíticos.

El estudio de sesgos constantes se efectuó según el método propuesto por Youden (7). En particular, se aplicaron las siguientes ecuaciones:

$$\delta = \frac{W_m \bar{x}_n - W_n \bar{x}_m}{W_m - W_n} \quad t = \frac{|\delta|}{|u_{\delta_{cte}}|}, \text{ con}$$

$$u(\delta_{cte}) = \frac{1}{W_m - W_n} \sqrt{(W_m * u(\bar{x}_n))^2 - (W_n * u(\bar{x}_m))^2}, \text{ donde}$$

- W_m y W_n son los dos pesos de alícuotas,
- x_n , x_m corresponden a la media de la masa (μg) medida de ácido pícrico y calculada a partir de las concentraciones obtenidas (tabla 5) y los volúmenes utilizados en la extracción.
- $u(x_m)$ y $u(x_n)$ las desviaciones típicas relativas de los resultados analíticos.

Los resultados obtenidos tras el cálculo de sesgo constante a ambos niveles de concentración empleando alícuotas de 0.25 y 0.5 g indicaron presencia de sesgo constante, por lo que se seleccionaron alícuotas de 0.5 g para los sucesivos análisis (tabla 7)

	3.9 $\mu\text{g.g}^{-1}$	44 $\mu\text{g.g}^{-1}$
d	0.40	2.45
u(d)	0.201	0.105
t	1.99	23

Tabla 7 – resultados obtenidos a partir de los ensayos de recuperación realizados a los dos niveles de concentración de ácido pícrico.

Acido gálico

El estudio de sesgos asociados al método propuesto, se realizó mediante marcado de una alícuota de 1.5 g de material pirotécnico al que se añadió 0.0038 g de ácido gálico en estado sólido. Tras la mezcla mediante agitación manual del vial durante cinco minutos, se analizaron por triplicado alícuotas de 0.1 y 0.25 g del material marcado. Se procedió a la extracción aplicando las siguientes condiciones experimentales:

- Disolvente de extracción: metanol, 10% de agua y 1% de ácido acético ($\text{mL}=20 \cdot \text{aliqu} \text{ (g)}$)
- Alícuota de material pirotécnico: entre 0.1 y 0.25 g.

Se prepararon asimismo muestras marcadas a bajos niveles de concentración tomando alícuotas de las preparadas en concentración más elevadas y agregando material pirotécnico (tabla 8).

CCa ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	Aliq (g)	CCa ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	CCe ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	R(%)
2536	0.10	254	181	0.71
			186	0.73
			130	0.51
	0.25		405	0.64
			384	0.60
			470	0.74
640	0.25		414	0.65
			322	0.51
			408	0.64
			394	0.62
139	0.25		352	0.55
			317	0.50
			353	0.56
			399	0.63

Tabla 8 – Estudio de la reproducibilidad analítica a partir del análisis de muestras de material pirotécnico marcado a distintos niveles de concentración y mediante pesada de alícuotas entre 0.1 y 0.25 g. Se indica CCa como la concentración de referencia o añadida expresada en $\mu\text{g.mL}^{-1}$ y CCe como la concentración encontrada en $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Análogamente al estudio realizado durante la optimización analítica de ácido pícrico, para estudiar si existía un sesgo constante, se aplicó el método de Youden pesando dos alícuotas de diferentes masas (de 0.1 y 0.25 g) de material pirotécnico previamente marcado y analizando por triplicado según el método propuesto. Los resultados obtenidos indicaron recuperaciones relativamente bajas, en torno al 65% que implicaron la necesidad de aplicar un factor de corrección a los resultados finales analíticos. Además, el cálculo de sesgo constante resultó en la presencia del mismo para análisis realizados con cantidades de muestra de 0.1 y 0.25 g (valor $t=8.56$).

3.2.3 – Estudio de precisión

Acido pícrico

La precisión por repetitividad fue del orden del 10% considerando como tal la desviación típica relativa deducida a partir de las series de análisis realizados con las alícuotas de material pirotécnico marcado a distintos niveles de concentración (tabla 6). En cuanto a la precisión intermedia ésta se calculó utilizando los datos citados y aplicando la siguiente ecuación

$$RSD_{pool} = \sqrt{\frac{RSD_{2536}^2 (n_{2536} - 1) + RSD_{640}^2 (n_{640} - 1) + RSD_{139}^2 (n_{139} - 1)}{(n_{2536} - 1)(n_{640} - 1)(n_{139} - 1)}}$$

El valor obtenido fue del orden del valor por repetibilidad en la dispersión de las medidas. En cuanto al cálculo del límite de detección para el análisis de ácido pícrico, a partir de los resultados obtenidos tras el análisis de las alícuotas de menor concentración se dedujo un valor de $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, considerando como área tres veces la desviación típica de dichos resultados (tabla 9).

	Desv est (s)	Factor resp	I.d. $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (3s)
Area1 – 5.79	0.30	5/87	0.5
Area2 – 5.93			
Area3 – 5.36			

Tabla 9 - Dedución del límite de detección del método analítico de ácido pícrico a partir de material pirotécnico marcado en concentración $3 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$.

Acido gálico

La precisión por repetibilidad fue del orden del 10% considerando como tal la desviación típica relativa deducida a partir de las series de análisis realizados con las alícuotas de material pirotécnico marcado a distintos niveles de concentración. En cuanto a la precisión intermedia ésta se calculó utilizando los datos citados y aplicando la siguiente ecuación

$$RSD_{pool} = \sqrt{\frac{(RSD_{3.9}^2 (n_{3.9} - 1) + RSD_{44}^2 (n_{44} - 1))}{(n_{3.9} - 1)(n_{44} - 1)}}$$

El valor obtenido fue del 9%. Teniendo en cuenta la influencia relativamente significativa del efecto matriz en este tipo de análisis, sería especialmente interesante la estimación de incertidumbre intermedia en base a otros tipos de materiales pirotécnicos que amplíen los resultados obtenidos.

En cuanto al cálculo del límite de detección para el análisis de ácido gálico, a partir de los resultados obtenidos tras el análisis de las alícuotas de menor concentración se dedujo un valor de $25 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, considerando como área tres veces la desviación típica de dichos resultados (tabla 10).

	Desv est (s)	Factor resp	I.d. $\mu\text{g.g}^{-1}$ (3s)
Area1 – 256	21.4	19/531	25
Area2 - 233			
Area3 – 263			
Area4 - 285			

Tabla 10 – Deducción del límite de detección del método analítico del ácido gálico obtenido a partir de material pirotécnico marcado en concentración de $139 \mu\text{g.g}^{-1}$.

4 - CONCLUSIONES

Una recopilación de los resultados obtenidos en relación al margen de aplicabilidad del método optimizado para el análisis de ambos ácidos se incluye en la siguiente tabla 11.

Acido	Alícuota (g)	R (%)	RSD _{pool} (%)	Intervalo aplicab ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	I.d. método ($\mu\text{g.g}^{-1}$)
Pítrico	0.5	74	9.0	4-50	0.5
Gálico	0.25	60	7.0	140-2540	25

Tabla 11 – Estudio del intervalo de aplicabilidad y establecimiento del límite de detección del método analítico.

Asimismo, un resumen de las condiciones optimizadas durante este trabajo se incluye a continuación (tabla 12).

Condiciones cromatográficas	Ac pítrico	Ac gálico
Columna cromatográfica	Agilent XD (5 μm , 150*4.6mm)	Agilent XD (5 μm , 150*4.6mm)
Fase móvil	Isocrático, Metanol/agua (AcOH, 1%)	Gradiente, Metanol/agua (AcOH, 1%)
Proporción	35/65	0' - 20/80 3' - 20/80 10' - 100/0 12' - 100/0 15' - 20/80 20' - 20/80
UV, ?	355 nm	274 nm
T ^a columna (°C)	25	25
Parámetros analíticos		
Intervalo lineal estudiado ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0.5-10	0.3-307
Lim detección instrumental ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0.2	0.1
Repetitividad (%)	9	7
Tratamiento muestra		
Condiciones analíticas	Disolvente: Agua (10% metanol, 1% AcOH) 0.50 g alícuota/5 mL disolvente	Disolvente: metanol (10% H ₂ O, 1% AcOH) 0.25 g alícuota/5 mL disolvente
Margen aplicabilidad ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	4-50	140-2540
Lím detec. Método ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	0.5	25
Precisión intermedia (%)	10	10

Tabla 12 – Conclusiones más relevantes obtenidas en este trabajo sobre la optimización de desarrollo analítico para la determinación de ácido pítrico y ácido gálico en muestras de material pirotécnico.

4 - BIBLIOGRAFIA

- 1 - EPA Method 8330.
- 2 - K. Polewiski, S. Kniat, D. Salwinska.; G. Nikolic, A. Veselinovic, Z. Mitin, S. Zivanovic. Scientific j. OF THE Faculty of Medicin in Nis. 2011;28 (4): 219-224.
- 3 - G. Nikolic, A. Veselinovic, R.S. Nolic, S.S. Mitic. Russian Journal of Physical chemistry a. 2011, 85(13), 2270-2273.
- 4 – A. C. Eslami, W. Pasanphan, B. A. Wagner, G.R. Buettner. Chemistry Central Journal. 2010, 4:15.
- 5 – P.G. Thorne, T.F. Jenkins. Field Analytical Chemistry and Technology. 1997, 1(3):165-170.
- 6 - D. Fei, J. Fang-ming, T. Ai-xi, Z. Ying, H. Ziqiang and Z. Fang-ging. Chinese J. of Analysis Laboratory. 2010. 2, 56-58.
- 7 – Maroto, A.; Boqué, R.; Riu, J.; Rius, X. Anal Chim Acta, 440, 2001, 171-184.

