

Desarrollo de un sistema de análisis en flujo con detección espectrofotométrica para la determinación de magnesio utilizando purpurina como ligando

Development of a flow analysis system with spectrophotometric detection for determining magnesium using purpurin as a ligand

Ovalles Fernando^{1*}, Galignani Máximo², Brunetto M Rosario².

¹Departamento de Análisis y Control, Facultad de Farmacia y Bioanálisis. ²Laboratorio de Espectroscopia Molecular, Departamento de Química, Facultad de Ciencias; Universidad de Los Andes. Mérida 5101A, Venezuela.

Recibido septiembre 2009 - Aceptado enero 2010

RESUMEN

En el presente trabajo se propone el desarrollo de un método de análisis en flujo continuo (AFC) con detección espectrofotométrica para la determinación de Mg(II) en muestras reales basado en la reacción entre el ion magnesio y el ligando purpurina (1,2,4 trihidroxiantraquinona). El método innovador basado en la determinación espectrofotométrica -fuera de línea- de ion magnesio fue adaptado a un sistema AFC con la finalidad de minimizar los efectos producidos por la volatilización del sistema disolvente (etanol al 50%, v/v) y la alta manipulación de reactivos. Parámetros críticos, tales como: fuerza iónica, pH del medio, estabilidad del ligando, sensibilidad y criterio de medida, entre otros, fueron evaluados. El criterio de medida utilizado consistió en la espectroscopia sustractiva [(quelato + ligando) – ligando], mediante evaluación del área integral de la absorción ($\lambda_2 = 565 \text{ nm}$ y $\lambda_1 = 450 \text{ nm}$) versus concentración. El intervalo dinámico resultó entre 0,5 y 5,4 $\mu\text{g Mg}^{2+} \text{ mL}^{-1}$ con un límite de detección $< 0,2 \mu\text{g Mg}^{2+} \text{ mL}^{-1}$ (3σ) y un coeficiente de correlación $> 0,999$. La frecuencia analítica fue 40 h^{-1} con una precisión $< 1,0 \%$ (DER, $n = 11$). La exactitud del método fue determinada utilizando dos productos farmacéuticos. Las pruebas t de Student y G de Cochran no evidenciaron falta de fiabilidad del método propuesto con un nivel de significancia del 95%. El efecto de interferencias por parte de los excipientes fue estudiado. El método propuesto podría ser adaptado a otros métodos que usan antraquinonas como agentes ligando con fines analíticos.

PALABRAS CLAVE

Purpurina, antraquinona, magnesio,

espectrofotometría, análisis en flujo.

ABSTRACT

In this paper, the development of a continuous flow analysis (CFA) method with spectrophotometric detection for Mg(II) determination in real samples based on the reaction between magnesium ion and the purpurin ligand (1,2,4 trihydroxyanthraquinone) is proposed. The innovative method based on a spectrophotometric determination -off line- of magnesium ion was adapted to a CFA system with the aim of minimizing the effects produced by the volatilization of the used dissolvent (ethanol 50% v/v) and because of the high manipulation of the reagents involved. Critical parameters such as ionic strength, pH of the medium, ligand stability, sensitivity and measurement criteria, among others, were evaluated. The used measurement criterion was the subtractive spectroscopy [(chelate + ligand) – ligand], by evaluating the integral area of absorption ($\lambda_2 = 565 \text{ nm}$ and $\lambda_1 = 450 \text{ nm}$) versus concentration. The dynamic interval resulted between 0.5 and 5.4 $\mu\text{g Mg}^{2+} \text{ mL}^{-1}$, with a detection limit $< 0.2 \mu\text{g Mg}^{2+} \text{ mL}^{-1}$ (3σ) and a correlation coefficient > 0.999 . The sampling frequency was 40 h^{-1} with a precision $< 1.0\%$ (RSD, $n = 11$). The accuracy of the method was determined by using two pharmaceutical products. Student's t-test and Cochran's G-test did not indicate lack of reliability of the proposed method at the 95% significance level. The effect of interference from the excipients was studied. The propose method could be adapted to other methods that use anthraquinones as ligand agents with analytical purposes.

*Correspondencia al autor: ovallesd@ula.ve

KEY WORDS

Purpurin, anthraquinone, magnesium, spectrophotometry, flow analysis.

INTRODUCCIÓN

Magnesio es un ion metálico de importancia biológica, farmacéutica y medioambiental. Por tanto, existe una gran variedad de métodos disponibles para la determinación de este ion en diferentes matrices, entre ellos, espectrofotometría de absorción molecular [1-3], espectrofluorescencia [4], espectrometría de absorción atómica [5-7], cromatografía iónica [8,9], electroforesis capilar [9], potenciometría [10], espectrometría de masas por plasma inductivamente acoplado [11], entre otros. El análisis de magnesio en productos farmacéuticos, suele realizarse mediante volumetría complejométrica [12-14]. Sin polemizar, con respecto a las ventajas y desventajas de un método sobre otro, los análisis en flujo continuo ofrecen diversas ventajas.

En la presente década se propuso la utilización de purpurina como agente ligando de ion magnesio para formar un quelato con absorción molecular en la región visible [1]; la principal desventaja de este método estriba en la amplia manipulación que implica la utilización de la espectrofotometría de absorción molecular fuera de línea, considerando que el medio disolvente contiene un alto porcentaje de fase orgánica volátil (50% de etanol).

Purpurina (Fig. 1), es una especie química perteneciente a la familia de las antraquinonas. Las aplicaciones analíticas y propiedades físico-químicas de las antraquinonas han sido discutidas con anterioridad [15]. A pesar de que las propiedades cromogénicas de la purpurina se conocen desde hace casi dos centurias [16], aun se continúan desarrollando métodos analíticos basados en esta propiedad [1,17-25].

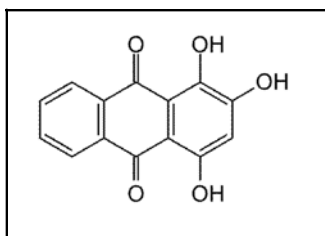


Fig. 1. Estructura de purpurina, también conocida como 1,2,4-trihidroxiantraquinona; 1,2,4-trihidroxi-9,10-antracenediona; 1,2,4-trihidroxi-9,10-antraquinona.

En el presente trabajo se propone el desarrollo de un método mediante análisis en flujo continuo (AFC), conservando los principios químicos y el sistema de detección de otro método propuesto fuera de línea [1]. Las ventajas que ofrece el trabajo mediante AFC son ampliamente conocidas [26].

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos y disoluciones

Todas las soluciones finales fueron diluidas apropiadamente de manera que el contenido hidroalcohólico (agua-etanol) mantuviese una proporción 45:55 (v/v). Agua Milli-Q (18,3 MΩ cm⁻¹) obtenida mediante un sistema SP TOC (Corporación Millipore, EUA), previa purificación por intercambio iónico. Etanol grado HPLC (98%, Mallinckrodt Baker, México). Las soluciones se utilizaron por un periodo no mayor a una semana durante el desarrollo experimental. Las muestras se conservaron bajo refrigeración.

Disolución de purpurina en etanol: una cantidad equivalente a 0,1281 g de purpurina (Pro-analysis, Merck, Darmstadt) fue transferida cuantitativamente a un matraz aforado de 500 mL de capacidad con ayuda de etanol absoluto, inmediatamente agitada y desgasificada durante 10 minutos con ayuda de un equipo de ultrasonido, y finalmente enrasada con el mismo disolvente. **Disolución de purpurina en medio hidroalcohólico:** una alícuota de la solución de purpurina en etanol, previa filtración (membrana de 0,22 μm de diámetro de la Corporación Millipore, Bedford, MA, EUA) fue diluida con agua para obtener una solución equivalente a 5,46x10⁻⁴ mol L⁻¹ en un medio hidroalcohólico 45:55 (v/v). **Disolución patrón de magnesio:** una solución acuosa equivalente a 100 μg Mg mL⁻¹ utilizando MgCl₂·6H₂O (99-101%, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) fue preparada utilizando agua como disolvente. **Disolución patrón intermedia de magnesio:** una solución de 15 μg Mg mL⁻¹ fue preparada a partir de la solución patrón madre, con ajuste del contenido hidroalcohólico final (45:55, v/v). **Disolución de cloruro de potasio:** la cantidad requerida de cloruro de potasio (reactivo ACS, ≥ 98,0% de Sigma Aldrich) fue pesada para preparar una solución 0,25 mol L⁻¹, en un medio hidroalcohólico 45:55 (v/v). **Disolución reguladora amoniacal:** una solución de cloruro de amonio (1 mol L⁻¹, preparada en un medio hidroalcohólico 45:55, v/v) y una solución de amoniaco (0,01 mol L⁻¹, preparada en un medio hidroalcohólico 45:55, v/v) fueron mezcladas en partes iguales. El pH de la solución resultante fue ajustado con solución de ácido clorhídrico 0,1 mol L⁻¹ y/o

solución de hidróxido de amonio 0,1 mol L⁻¹.

Estudio del efecto de pH

Los valores de pH fueron registrados utilizando un analizador digital de pH Orion Research modelo 701A (Cambridge, MA, EUA), provisto de un electrodo de vidrio marca EIKay. La evaluación del efecto de pH se realizó con soluciones diluidas de HCl, NaOH, NH₄OH, NH₄Cl y solución amortiguadora NH₄OH/NH₄Cl. Los valores de pH fueron registrados en un medio agua-etanol 45:55 (v/v), sin corrección complementaria.

Configuración del sistema AFC-EAM y procedimiento

La Fig. 2 muestra el diagrama esquemático de la configuración para el análisis en flujo continuo (AFC) con detección por espectrofotometría de absorción molecular (EAM) en la región visible. El instrumento utilizado consistió en un espectrofotómetro UV/Vis modelo Lambda 20, equipado con un par de celdas de cuarzo para flujo, modelo B00631150 y un software UV WinLab para Windows; todos de Perkin-Elmer (Norwalk, CT, EUA).

La configuración del sistema AFC fue diseñada empleando i) una bomba peristáltica Ismatec IPC de cuatro canales (Glattbrugg, Suiza); ii) tubería tipo Viton[®] de color negro, de la casa comercial Ismatec (Glattbrugg, Suiza); y iii) tubería tipo PTFE (Teflón[®]) para las extensiones y modelado de los serpentines de reacción. El sistema fue diseñado de manera tal que permitiera el flujo de cada reactivo de forma independiente para generar en línea el complejo PURP-Mg en el último serpentín de reacción (SR3).

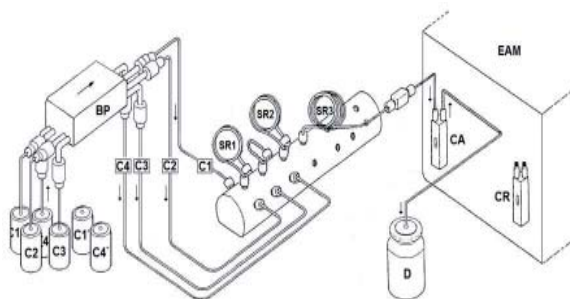


Fig. 2. Esquema del sistema de análisis en flujo. C1= solución de purpurina; C1' y C4'= medio disolvente (agua/etanol); C2= solución de KCl; C3= solución amortiguadora (NH₄OH/NH₄Cl; pH = 9,5); C4= solución patrón o muestra; BP= bomba peristáltica; SR= serpentines de reacción; CA= celda analítica; CR= celda de referencia; EAM= espectrofotómetro de absorción molecular UV/Vis; D= desecho. Cada uno de los recipientes fue sellado con papel parafinado. Otras condiciones son descritas en la Tabla 1.

La señal de fondo y la señal del blanco fueron obtenidas después de transcurridos 5 minutos de flujo de los canales C1', C2, C3 y C4' (Fig. 2 y Tabla 1). Las cubetas de detección CA y CR fueron conectadas en serie durante este procedimiento. El registro espectral del ligando PURP se realizó mediante sustitución de C1' por C1. De manera similar, el registro del complejo PUR-Mg (patrón o muestra) se realizó mediante sustitución de C4' por C4. El barrido espectral en la región visible (400-700 nm) a una velocidad de 960 nm min⁻¹ fue registrado como señal analítica. Los espectros fueron guardados utilizando un procesador y posteriormente procesados electrónicamente utilizando el software UV WinLab para Windows.

El criterio de medida seleccionado consistió en el uso de la espectroscopia sustractiva: espectro del complejo (quelato + ligando) menos el espectro del ligando, y posterior determinación del área integral del espectro resultante. Esta señal de respuesta fue utilizada para la obtención del perfil de calibración en el intervalo de trabajo seleccionado. La curva de calibración fue construida con soluciones patrones de Mg²⁺ en el intervalo 0,6 y 5,4 µg mL⁻¹, a partir de la solución de trabajo 15,0 µg mL⁻¹, preparada a partir de cloruro de magnesio hexahidratado. El estudio de interferencias mediante la técnica de calibración por adiciones patrón consistió en agregar varias alícuotas de los patrones (0,6 - 4,8 µg mL⁻¹) a cada una de las muestras reales (≈ 0,6 µg mL⁻¹).

El efecto de interferencia fue estudiado utilizando 1 µg mL⁻¹ de ion magnesio y concentraciones variables de los posibles interferentes hasta lograr concentraciones equimolares: lactato de sodio, dextrosa, Ca(II), Fe(II), Fe(III), Al(III) y Cu(II).

Validación del método analítico

La validación del método se realizó siguiendo las pautas establecidas por la Conferencia Internacional sobre Armonización (ICH, por sus siglas en inglés) para la validación de métodos analíticos [27]. El procesamiento estadístico se realizó con el programa de cómputo Microcal Origin 70 (Corporación OriginLab, Northampton, MA, EUA). **Linealidad.** La regresión lineal y coeficiente de correlación derivados del método de calibración fueron obtenidos de la manera usual; la gráfica de calibrado fue construida utilizando nueve disoluciones de ion magnesio

con concentraciones correspondientes al 20 - 180 % de la concentración de trabajo ($3,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) y las señales de absorbancia resultantes (área integral). Los criterios de aceptación fueron: $r > 0,99$; intercepto no significativamente diferente de cero y pendiente no significativamente diferente de uno. **Exactitud y estudio de interferencias.** Disoluciones patrones de ion magnesio con concentraciones entre 20 y 160% de la concentración de trabajo fueron adicionadas a cada muestra de acuerdo al método de adición estándar. Las medias (porcentajes) calculadas con las concentraciones adicionadas fueron evaluadas a través de la prueba *t* de Student. También, las dispersiones para cada uno de los niveles evaluados fueron comparadas mediante la prueba G de Cochran. Los estadígrafos totales expresados como porcentaje de recuperación (% R) y coeficiente de variación (CV) fueron comparados con los criterios de aceptación, establecidos como: 90-110 % de R y $< 3,0$ % de CV. Las pendientes derivadas de la curva de calibración externa y calibración por adición estándar fueron estadísticamente contrastadas para determinar el efecto de matriz (excipientes). **Precisión instrumental.** Una disolución muestra conteniendo $3,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ de ion magnesio fue evaluada por un mismo analista en un mismo día ($n= 11$ réplicas). El coeficiente de variación de los estadígrafos totales fue establecido en $\leq 2,0$ % para el sistema AFC-EAM propuesto. **Repetibilidad entre días:** Una disolución patrón conteniendo $3,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ de ion magnesio fue evaluada por un mismo analista en tres días consecutivos ($n= 3$ réplicas, en cada caso). El coeficiente de variación de los estadígrafos totales fue establecido en $\leq 3,0$ % para el sistema AFC-EAM propuesto. **Repetibilidad del método.** Disoluciones patrón de ion magnesio correspondientes al 80, 100 y 120 % de la concentración de trabajo ($3,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) fueron adicionadas a cada muestra en particular ($0,6 \mu\text{g mL}^{-1}$), por triplicado, por el mismo analista, en el mismo laboratorio, el mismo día, con el mismo equipo y reactivos. En cada caso, se estimó el CV para cada nivel de concentración considerando como criterio de aceptación: $\leq 3,0\%$. **Selección de variables y adaptación del método innovador al sistema AFC.** Los parámetros experimentales del método innovador fueron adaptados al método propuesto. En los casos en los que se requirió optimización, ésta fue realizada por el método univariado.

TABLA 1
Estudio y selección de las variables involucradas en el sistema AFC-EAM

Variable	Intervalo estudiado	Valor seleccionado
Sistema AFC		
Longitud del serpentín S_{R1} (cm)	0 - 100	25
Longitud del serpentín S_{R2} (cm)	0 - 100	35
Longitud del serpentín S_{R3} (cm)	0 - 1000	250
Diámetro interno de S_{R1} (cm)	-	0,05
Diámetro interno de S_{R2} (cm)	-	0,05
Diámetro interno de S_{R3} (cm)	0,05 y 0,08	0,08
Caudal canal C1 (mL min^{-1})	0,5 - 2,0	1,0
Caudal canal C2 (mL min^{-1})	0,25 - 1,0	0,50
Caudal canal C3 (mL min^{-1})	0,25 - 1,0	0,50
Caudal canal C4 (mL min^{-1})	0,5 - 2,0	1,0
Instrumentales		
Velocidad de barrido (nm min^{-1})	120 - 2880	960
Ancho de banda (nm)	fijo	1
Intervalo espectral	350 - 750	400 - 700
Capacidad de la cubeta-flujo (μL)	-	300
Paso óptico (mm)	-	10
Longitud de onda analítica (nm)	en el texto	538
Químico		
Disolvente hidroalcohólico (v/v)	(80:20) - (0:100)	45:55
Concentración de Purpurina (mol L^{-1})	-	$5,46 \times 10^{-4}$
Concentración de Mg^{2+} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,2 - 10	0,5 - 5,4
Concentración de KCl (mol L^{-1})	0,1 - 1,0	0,25
Buffer: $\text{NH}_4\text{OH}/\text{NH}_4\text{Cl}$ (mol L^{-1})	0,05-3,0 / 0,01-0,30	1,0 / 0,01
Valor de pH	2 - 12	9,5
Ajuste de pH = 9,5 con NH_4OH	-	0,1 - 1,0

RESULTADOS

Selección de los parámetros del sistema de análisis en flujo continuo

Las condiciones experimentales propuestas en el trabajo innovador [1], realizado fuera de línea, fueron adaptadas al sistema en línea propuesto en este trabajo. En este sentido, el volumen total (25 mL) producto de la mezcla de reactivos -propuesta por el método innovador- para la generación del complejo PURP-Mg fue reducido a la décima parte ($2,5 \text{ mL min}^{-1}$) en el sistema AFC propuesto en este trabajo. La reducción del volumen requerido fue lograda manteniendo la bomba peristáltica a una velocidad de flujo constante y variando el diámetro de la tubería. Un esquema del sistema propuesto es mostrado en la Fig. 2. También, un resumen de las variables estudiadas del sistema AFC, junto con el intervalo evaluado y el valor seleccionado

es presentado en la Tabla 1. La comprobación y ajuste de los parámetros experimentales se realizó por el método univariado. Los caudales que se presentan en la Tabla 1 fueron seleccionados como un compromiso entre sensibilidad, consumo de reactivos, frecuencia de análisis y ajuste al análisis espectrofotométrico fuera de línea. Las variables químicas críticas para la formación del complejo PURP-Mg se presentan gráficamente en apartados subsiguientes.

Caracterización espectral

Tanto el ligando como el complejo presentaron absorción en la región espectral visible, entre 350 y 640 nm (Fig. 3). El ligando PURP presentó un solo máximo de absorción a 515 nm y el complejo PURP-Mg presentó dos máximos de absorción, uno a 512 y otro a 534 nm, ambos prácticamente con la misma intensidad. Los espectros característicos del ligando y del complejo coincidieron relativamente con los reportados en la literatura [1].

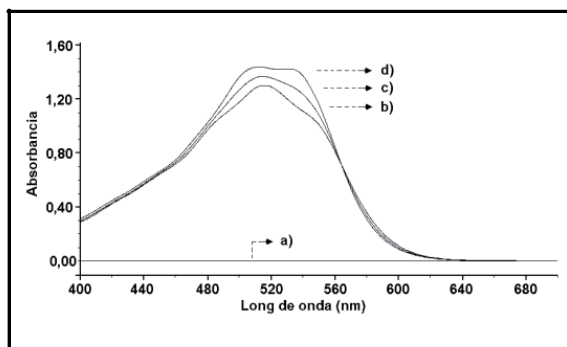


Fig. 3. Espectros de absorción de: a) solución blanco (agua/etanol + $\text{NH}_4\text{OH}/\text{NH}_4\text{Cl}$ + KCl + $\text{pH} = 9,5$); b) purpurina ($5,46 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$); c) complejo purpurina-magnesio ($1,23 \times 10^{-4} \text{ mol Mg L}^{-1}$); y d) complejo purpurina-magnesio ($2,22 \times 10^{-4} \text{ mol Mg L}^{-1}$) contra una solución blanco. Otras condiciones experimentales son descritas en la Tabla 1.

Estabilidad de la solución de purpurina

El ligando PURP mostró una estabilidad relativamente aceptable durante la primera hora (Fig. 4), con una variación negativa sólo del 0,3%; y un decremento $< 3\%$ durante las siete horas restantes, lapso durante el cual no fue corregida la señal de fondo. El inserto de la Fig. 4 muestra espectros representativos y equivalentes al estudio de estabilidad. La estabilidad del complejo no fue estudiada pues se consideró irrelevante para el sistema AFC propuesto; la formación del complejo ocurre en línea e inmediatamente la señal es monitoreada.

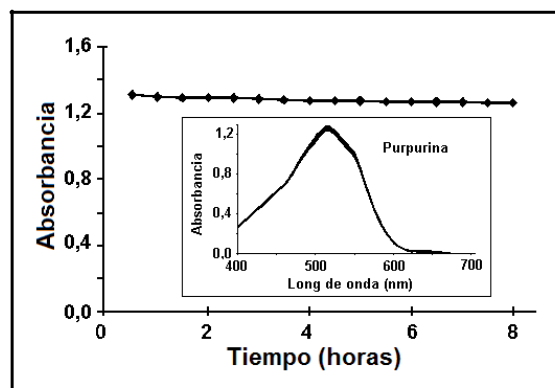


Fig. 4. Efecto del tiempo sobre la estabilidad del ligando en el medio hidroalcohólico seleccionado, registrado en función de la señal de absorbancia a 515 nm. Inserto: espectros de absorción representativos del ligando registrados durante el estudio de estabilidad. $[\text{PURP}] = 5,46 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

Selección de la proporción del medio hidroalcohólico

La purpurina es poco soluble en agua, razón por la cual se utiliza un medio hidroalcohólico para aumentar su solubilidad [1]. En este sentido, la relación volumen/volumen entre agua y etanol fue estudiado entre 80:20 y 0:100, tal como se muestra en la Fig 5. El máximo de absorbancia de la purpurina ($\lambda = 515 \text{ nm}$) fue observado con una proporción agua/etanol prácticamente equivalente (50:50, v/v). Una proporción 45:55 (v/v) agua/etanol fue seleccionada para asegurar la total disolución del ligando y una señal constante durante el análisis espectrofotométrico. Esta solución hidroalcohólica fue utilizada como medio disolvente de todos los reactivos, patrones y muestras.

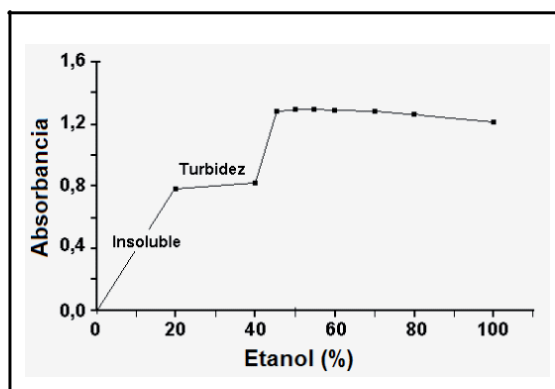


Fig. 5. Efecto del medio hidroalcohólico sobre la solubilidad del ligando, registrado en función de la señal de absorbancia de la PURP a 515 nm. $[\text{PURP}] = 5,46 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

Efecto del pH sobre la formación del complejo PURP-Mg

La Fig. 6 A muestra los espectros del ligando (PURP) obtenidos a diferentes valores de pH. El máximo de absorción ($\lambda \approx 515$ nm) del ligando aumentó a medida que el valor de pH también aumentó (2 \rightarrow 12 unidades). La menor influencia del pH del medio sobre el aspecto de los espectros fue observada entre 7,0 y 9,5 unidades de pH.

La Fig. 6 B muestra los espectros del complejo (PURP-Mg) obtenidos a diferentes valores de pH. El máximo de absorción (≈ 534 nm) del complejo aumentó a medida que el valor de pH fue incrementado desde 2 hasta 10 unidades. Una disminución importante del máximo de absorción fue observado a partir de valores de pH >10 unidades.

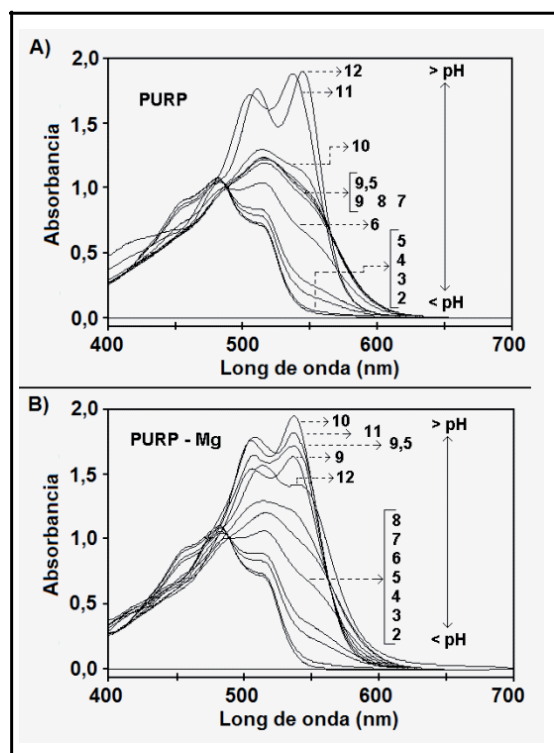


Fig. 6. A) Espectros de absorción del ligando (PURP) a diferentes valores de pH. B) Espectros de absorción del complejo (PURP-Mg) a diferentes valores de pH. [PURP] = $5,46 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ y [Mg²⁺] = $2,47 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹.

Determinación de la estequiometría del complejo PURP-Mg

Debido al comportamiento espectral del sistema, en el que, tanto el ligando como el complejo absorben a la misma longitud de onda analítica, fue necesario efectuar correcciones y verificaciones de: i) fuerza iónica constante; ii) valor de pH constante;

iii) una longitud de onda donde el complejo fuese relativamente la única especie responsable de la absorción (mediante la utilización de la espectroscopia sustractiva); y iv) confirmación de la ley de Beer.

Los ensayos preliminares permitieron conjeturar la formación de un complejo mononuclear; esto es un compuesto de coordinación en cuya molécula sólo es de esperar un átomo de magnesio (M) enlazado a una o más moléculas de PURP (nX), sin que existan enlaces metal-metal, tal como: $M + nX \rightleftharpoons MX_n$. Basados en esta premisa, la estequiometría del complejo fue evaluada aplicando el método de las variaciones continuas o de Job [28].

El método de las variaciones continuas fue aplicado de la manera usual, manteniendo constante la concentración molar total: $[(nX) + (M) = 1]$; mientras se varió la relación de uno respecto del otro: $[X] =$ desde $2,0 \times 10^{-4}$ hasta $2,0 \times 10^{-5}$ y $[M] =$ desde $2,0 \times 10^{-5}$ hasta $2,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. Valores entre 0 y 1 para la fracción molar del metal fueron graficados en función de la señal analítica de cada especie química involucrada utilizando el criterio de medida seleccionado (Fig. 7 A).

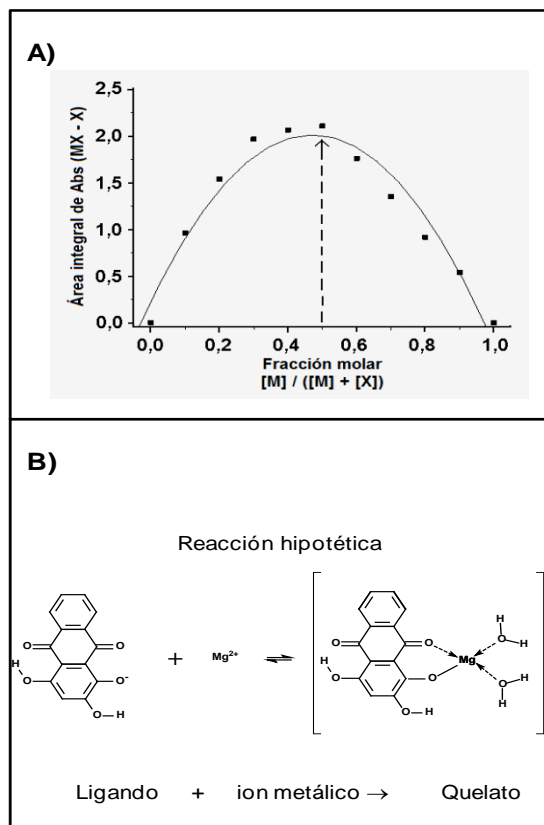


Fig. 7. A) Determinación de la estequiometría del complejo PURP-Mg (MX_n) por el método de las variaciones continuas. [PURP] = [X] y [Mg²⁺] = [M]. B) Reacción hipotética a pH = 9,5 manteniendo un exceso del ligando con respecto al metal.

Los resultados no mostraron un máximo correspondiente a una fracción molar exacta en particular. No obstante, el vértice de la curva experimental presentó tendencia hacia la redondez, por tanto, el punto máximo que da la estequiometría del complejo fue obtenido por extrapolación utilizando un ajuste polinomial (curva de la Fig. 7 A). Este análisis reflejó una estequiometría más cercana a un complejo 1:1 (vértice en fracción molar = 0,5), que a un complejo 1:2 (vértice en fracción molar = 0,33). Este comportamiento suele ser propio de complejos cuyas constantes de formación no son relativamente elevadas. La Fig. 7 B muestra la reacción hipotética de formación del complejo PURP-Mg.

Selección del criterio de medida analítico

La Fig. 8 A muestra los espectros de absorción característicos del ligando y del complejo, mientras la Fig. 8 B muestra el espectro resultante de la espectroscopia sustractiva. Los parámetros analíticos resultantes de varios criterios de medida evaluados son descritos en la Tabla 2.

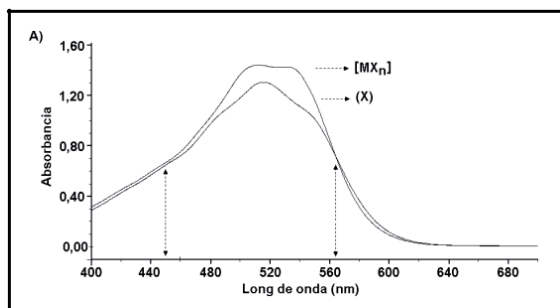


Fig. 8. Selección del criterio de medida. A) Espectros de absorción del ligando purpurina (X) y complejo purpurina-magnesio (MX_n).

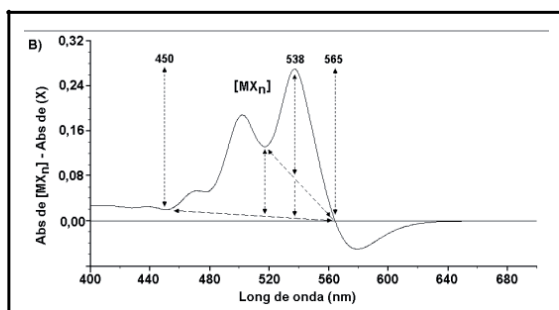


Fig. 8. B) Espectro resultante de la espectroscopia sustractiva. [Mg²⁺] = 5,4 µg mL⁻¹, bajo las condiciones experimentales establecidas en la Tabla 1.

Considerando la espectroscopia sustractiva, tanto el área como la altura de la banda espectral (absorbancia) ubicada entre 450 y 630 nm -con corrección de línea base- fueron evaluadas con la finalidad de encontrar un criterio de medida apropiado (Fig. 8 B). El cumplimiento de la ley de Beer fue comprobado independientemente del criterio de medida evaluado utilizando un intervalo de trabajo entre 0,6 y 6,0 µg mL⁻¹ (Tabla 2). En principio, tanto la absorbancia (Abs_{max}) como el área integral de la banda espectral, resultaron apropiadas para el objetivo planteado. No obstante, como un compromiso entre las características analíticas obtenidas con la calibración lineal externa (coeficiente de correlación, límite de cuantificación, sensibilidad y precisión), el área integral con corrección de línea base entre 565 y 450 nm fue seleccionada (Fig. 8 B).

TABLA 2

Parámetros analíticos resultantes de varios criterios de medida utilizando el método propuesto AFC-EAM

Criterio de medida (nm)	Parámetros resultantes ^a					
	Banda espectral ^b	Corrección (Base: λ ₁ - λ ₂)	Ecuación (Regresión lineal)	Coefficiente (r)	LDC ^c (µg mL ⁻¹)	DER ^d (%)
Absorbancia (λ _{max} 538 nm)	579-450		Y= 0,0047+0,0545 [X]	0,9996	0,56	1,4
	579-518		Y= 0,0026+0,0010 [X]	0,9995	0,63	2,6
	565-450		Y= 0,0031+0,0490 [X]	0,9997	0,49	1,1
	565-518		Y= 0,0020+0,0358 [X]	0,9996	0,57	2,3
	518-550		Y= 0,0020+0,0228 [X]	0,9995	0,62	3,4
Área (integral)	579-450		Y= 0,4359+2,7967 [X]	0,9995	0,63	0,96
	579-518		Y= 0,0763+0,8544 [X]	0,9992	0,79	2,7
	565-450		Y= 0,3049+2,3554 [X]	0,9996	0,52	0,62
	565-518		Y= 0,0429+0,8464 [X]	0,9995	0,63	1,8
	518-477		Y= 0,1069+0,2632 [X]	0,9983	1,1	3,6

^a Intervalo de trabajo: 0,6 – 6,0 µg Mg²⁺ mL⁻¹ a partir de MgCl₂·6H₂O. ^b Banda espectral del complejo obtenida mediante espectroscopia sustractiva [(Abscomplejo + Absligando) - Absligando = Abscomplejo]. ^c Límite de cuantificación. ^d Desviación estándar relativa determinada con la concentración intermedia (n = 3).

Características analíticas del método AFC-EAM

Linealidad del sistema: La curva de calibración para el sistema AFC-EAM -ajustada de acuerdo a los ensayos preliminares-, resultó lineal en un intervalo de concentración entre 0,5 y 5,4 µg Mg²⁺ mL⁻¹ (Tabla 3),

con un coeficiente de correlación $> 0,999$; el cual fue considerado como aceptable considerando el criterio de aceptación para una correlación significativa al 95% de confianza ($t_{exp} = 163 \gg t_{tab} = 2,12$) y bajo la inspección visual de la curva de calibración.

Por otra parte, se encontró que el intercepto no fue significativamente diferente de cero con un 95% de confianza ($t_{exp} = 5,90 > t_{tab} = 2,12$). Además, este intercepto en la ordenada resultó $< 5\%$ de la respuesta obtenida para el analito a la mitad del intervalo dinámico, valor que suele considerarse aceptable.

TABLA 3
Figuras de mérito del método propuesto AFC-EAM

Parámetro	Datos
Intervalo dinámico ($\mu\text{g Mg}^{2+}\text{mL}^{-1}$) ^a	0,5 – 5,4
Ecuación de la recta de regresión ($Y = a + bX$)	$Y = 0,283 + 2,370 [X]$
Coefficiente de correlación (r)	0,9997
Desviación estándar de la pendiente (S_b)	0,015
Desviación estándar de la ordenada (S_a)	0,048
Desviación estándar del coeficiente ($S_{y/x}$)	0,11
Nivel de confianza al 95% de "b"	$\pm 0,035$
Nivel de confianza al 95% de "a"	$\pm 0,11$
Límite de detección (3σ) en $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,13
Límite de cuantificación (10σ) en $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,45
Número de soluciones ensayadas por réplica	9 x 3
Repetibilidad de la respuesta analítica (CV) ^b	0,75%
Frecuencia analítica (muestras h^{-1}) ^c	48

^a Solución preparada a partir de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. ^b Coeficiente de variación para M2 ($n = 11$) determinado para el 100% ($3,0 \mu\text{g Mg}^{2+} \text{mL}^{-1}$). ^c Frecuencia por réplica = cada 40 segundos.

Alternativamente, la linealidad del método fue evaluada por la técnica de adición estándar. La Tabla 4 muestra resultados representativos para tres niveles de concentración. Los coeficientes de correlación y pendientes obtenidos para las muestras no difirieron significativamente: (i) calibración externa, $Y = 0,283 + 2,370 [X]$, ($r = 0,9997$); (ii) calibración por adición estándar para M1, $Y = 1,733 + 2,355 [X]$ ($r = 0,9992$); (iii) calibración por adición estándar para M2, $Y = 1,710 + 2,366 [X]$, ($r = 0,9987$).

Repetibilidad de la respuesta analítica: el resultado mostró un coeficiente de variación (CV) mejor que la unidad porcentual; resultado aceptable considerando como criterio de aceptación $\leq 2,0\%$. Repetibilidad entre días: la precisión resultó $2,7\%$; resultado aceptable considerando como criterio de aceptación $\leq 3,0\%$ para el sistema AFC-EAM planteado. **Repetibilidad del método:** los CV porcentuales fueron

determinados utilizando los resultados obtenidos para los estudios de exactitud. En cada caso, se estimó el CV para cada nivel de concentración resultando: $2,2\%$ (nivel inferior), $1,1\%$ (nivel intermedio) y $0,5\%$ (nivel superior); resultados aceptables considerando como criterio de aceptación: $\leq 3,0\%$.

TABLA 4
Estudio de recuperación utilizando el método propuesto AFC-EAM

Muestra ^a	Concentración ($\mu\text{g Mg}^{2+}\text{mL}^{-1}$)			Criterios estadísticos ^{b,c}	
	Muestra (endógeno)	Patrón (adicionado)	Encontrado (total)	Desviación estándar	Recobrado (%)
M1		2,40	3,06	0,03	102,2
	0,612	3,00	3,64	0,02	101,0
		3,60	4,33	0,02	103,3
M2		2,40	2,98	0,02	99,3
	0,602	3,00	3,64	0,01	100,0
		3,60	4,11	0,01	97,5

^a M1 = Solución electrolítica de Cloruro de magnesio ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). M2 = Magnesia San Pellegrino [$\text{Mg}(\text{OH})_2$]. ^b Prueba G de Cochran: $G_{exp} = 0,12$ para M1 y $G_{exp} = 0,52$ para M2; $G_{tab} (p = 0,05; k = 3; n = 3) = 0,87$. ^c Recuperación promedio: M1 = $102,1 (\pm 1,2 \text{ CV})$ y M2 = $98,9\% (\pm 1,3 \text{ CV})$. Prueba t de Student para el % de recuperación: $t_{exp} = 0,40$ para M1 y $t_{exp} = 0,46$ para M2; donde $t_{tab} (p = 0,05; n = 9) = 1,86$.

Exactitud. El método de adición estándar fue aplicado en esta propuesta analítica. La Tabla 4 describe parcialmente los resultados obtenidos mediante este método. La prueba G de Cochran aplicada a los resultados obtenidos no evidenció influencia del factor concentración sobre la variabilidad de los resultados, ya que, tanto G_{exp} de M1, como G_{exp} de M2 resultaron $< G_{tab}$. La prueba t de Student no reveló diferencias significativas entre la recuperación media obtenida (para ambas muestras) y el 100% de recuperación ya que t_{exp} de M1, como t_{exp} de M2 resultaron $< t_{tab}$.

Por otra parte, el método propuesto AFC-EAM fue aplicado satisfactoriamente al análisis de muestras reales (Tabla 5). La concentración encontrada, en cada caso, fue consistente con el valor declarado en la etiqueta de cada producto, dentro de un intervalo inferior a $\pm 5\%$. Adicionalmente, el espectro de absorción en la región visible registrado para la sustancia de referencia y las dos muestras (M1 y M2) coincidieron con el máximo a 538 nm , no observándose otras diferencias espectrales o desplazamientos (Fig. 9).

Especificidad y estudios de interferencia. Dos muestras de productos farmacéuticos que declaraban contener cloruro de magnesio o hidróxido de magnesio fueron analizadas por el método propuesto (Tabla 5). En cada caso se calculó el % de recuperación promedio y luego se comparó estadísticamente con

el 100 % esperado mediante la prueba *t* de Student de una cola (Tabla 4). La naturaleza de la formulación M1 de acuerdo al laboratorio que lo manufactura (Departamento de Galénica, Facultad de Farmacia, Mérida, Venezuela) consiste simplemente en una solución electrolítica de cloruro de magnesio; mientras la naturaleza de la formulación M2 (hidróxido de magnesio) es más compleja ya que contiene excipientes (sacarosa, bicarbonato de sodio y ácido tartárico). El análisis de estas muestras no evidenció estadísticamente (Tabla 4) y gráficamente (Fig. 9) efecto de matriz.

El análisis de otros productos farmacéuticos conteniendo cloruro de magnesio y concomitantemente ion calcio (CaCl_2) reveló fuerte interferencia espectral. La presencia de otros iones tales como, aluminio, cobre e hierro (II y III) también presentaron interferencia espectral en proporciones de al menos 1:1 (p/p).

TABLA 5
Análisis de muestras reales utilizando el método propuesto AFC-EAM

Muestras	Concentración	
	Declarada	Encontrada ^a
Solución electrolítica de Cloruro de magnesio		
(Formulación magistral, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$).	3,3% p/v	3,3 ($\pm 0,2$) % p/v
Magnesia San Pellegrino		
[Producto farmacéutico comercial, $\text{Mg}(\text{OH})_2$].	85% p/p	81,2 ($\pm 0,9$) % p/p

^a N° de réplicas = 3.

Otras especies químicas que suelen estar presentes como excipientes de productos farmacéuticos, tales como, sacarosa, bicarbonato de sodio y lactato de sodio fueron evaluadas. Entre ellas, sólo el lactato de sodio causó depresión importante de la señal de absorbancia.

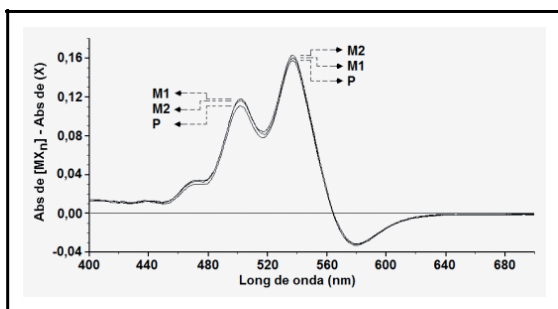


Fig. 9. Espectros representativos de: P = patrón de ion magnesio ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$); M1 = muestra de una solución electrolítica de cloruro de magnesio; y M2 = muestra de hidróxido de magnesio. $[\text{Mg}^{2+}]$ equivalente en todos los casos a $3,0 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Robustez: La señal de respuesta del ligando

presentó baja variabilidad dentro de un intervalo de pH aceptable (7,0-9,5) y estabilidad garantizada durante una jornada de trabajo. La estabilidad del complejo, por otra parte, puede considerarse irrelevante tomando en consideración el sistema en línea (AFC) planteado. La preparación de todas las soluciones se realizó con el mismo medio disolvente (agua/etanol 45:55, v/v) para garantizar una fase disolvente orgánica constante y la inhibición en la formación de burbujas en el sistema AFC. La precisión del método o variación de la señal de respuesta producto de la volatilidad del medio disolvente fue mejorada utilizando el sistema AFC acoplado a una celda para flujo de capacidad en el orden de los μL .

DISCUSIÓN

Purpurina es una especie química perteneciente a la familia de las antraquinonas, usado en el análisis espectrofotométrico de metales. Sus propiedades como agente ligando han sido estudiadas desde principios del siglo pasado [16]. No obstante, en la presente década, junto a otros tipos de ligando antraquinónicos, ha resurgido su aplicación en la determinación de metales en diversas muestras [1,17-25]. Todos estos métodos espectrofotométricos han sido propuestos fuera de línea, sin considerar la volatilidad del medio disolvente (solución hidroalcohólica). En este sentido, los análisis espectrofotométricos en línea resultan de gran utilidad ya que facilitan la introducción de un sistema cerrado, incluyendo la cubeta de medición, cuya manipulación siempre resulta engorrosa en los sistemas fuera de línea.

En función de las inferencias descritas anteriormente se estableció como objetivo, la adaptación y acoplamiento del método espectrofotométrico innovador [1] a un sistema de análisis en flujo continuo (AFC) sin inyección.

En general, el acoplamiento AFC por inyección (FIA, por sus siglas en inglés) con la espectrofotometría de absorción molecular (EAM) se realiza monitoreando el comportamiento de la absorbancia (en el máximo de absorción) en función del tiempo. Esta modalidad, ampliamente utilizada, resulta muy útil en sistemas simples, donde los reactivos no absorben concomitantemente con el producto, generando en consecuencia solapamiento de las bandas de absorción espectral. Nuestro equipo de trabajo viene proponiendo en los últimos años el acoplamiento AFC-EAM en lugar de AFI-EAM con la finalidad de aprovechar la información que suministra el registro espectral y por ende sus ventajas, tales como la detección de: i) desplazamientos de la línea

base generados por variación en la concentración, ii) efecto Schindler o variación del coeficiente de absorptividad dependiente de los cambios en el índice de refracción, iii) otras especies absorbentes, iv) interferencias espectrales provenientes de la matriz, entre otras. Adicionalmente, el registro espectral permite la manipulación electrónica (software) de los mismos mediante la espectroscopia sustractiva o derivativa para encontrar soluciones simples y elegantes a los problemas arriba mencionados. Precisamente, estos principios fueron aplicados en el desarrollo del método propuesto debido a la absorción concomitante del ligando y del complejo en la misma región espectral. La estrategia consistió en la utilización de la espectroscopia sustractiva -además del sistema AFC- para eliminar la señal del ligando y poder establecer un criterio de medida adecuado. El criterio de medida (área integral de la banda espectral generada por el complejo versus concentración del ion magnesio) fue seleccionado después de explorar diversas alternativas (Tabla 2). La espectroscopia derivativa propuesta en el método innovador [1] también fue explorada y contrastada, sin embargo, ésta fue descartada por implicar un procesamiento de datos adicional e innecesario dado que se obtuvieron resultados equivalentes.

En relación a la optimización del sistema AFC la mayor limitación encontrada fue la aparición de burbujas en los serpentines de reacción, dificultad que fue resuelta preparando todos los reactivos y muestras en el mismo medio hidroalcohólico previo al análisis en flujo. Otro parámetro crítico, resultó la selección del pH del sistema. Se sacrificó sensibilidad a favor de la estabilidad del ligando y del mismo complejo. La selección de un valor de pH = 9,5 coincidió experimentalmente con el trabajo innovador, el cual declara la presencia estable de la purpurina (XH_3) bajo la forma XH_2^- , generando en consecuencia un complejo también relativamente estable del tipo 1:1 ($[\text{MgXH}_2]^+$) [1].

En lo que respecta a la validación, el método resultó lineal, preciso y exacto. El resultado de la regresión lineal mostró un coeficiente de correlación altamente superior ($>0,999$) al criterio de aceptación, con un intercepto significativamente no diferente de cero ($p = 0,05$) garantizando la correlación lineal entre la concentración y la señal analítica seleccionada. Aunque se obtuvo un intervalo lineal estrecho, el mismo se adoptó adecuadamente al análisis planteado, puesto que los productos farmacéuticos suelen ser formulados con concentraciones elevadas del fármaco (Tabla 3). El estudio de precisión mostró una buena repetibilidad, tanto instrumental como del método, de

acuerdo con los criterios de aceptación (Tabla 3 y 4). El porcentaje de recuperación -en la muestra de mayor complejidad- resultó dentro de los criterios de aceptación ($< 5\%$), evidenciando probable ausencia de interferencias por parte de los excipientes; además no se obtuvieron diferencias significativas entre la recuperación media y el 100% al aplicar la prueba t de Student, confirmando la fiabilidad del método. Adicionalmente, la prueba G de Cochran, aplicada a los estudios de recuperación, indicaron que las concentraciones empleadas no influyeron en la variabilidad de los resultados al menos con un nivel de significancia del 95% (Tabla 4). La utilidad del método propuesto se comprobó satisfactoriamente en dos formulaciones farmacéuticas (Tabla 5).

El estudio de interferencias permitió inferir que el método resulta libre de interferencias espectrales en presencia de impurezas encontradas por debajo del 1% (p/p); pero presenta efecto de interferencias en aquellos casos que se pretenda la determinación selectiva de ion magnesio en presencia de concentraciones cercanas a la equimolar de iones tales como calcio, aluminio y hierro. La presencia de calcio interfirió a concentraciones tan bajas como 10% con respecto a la concentración de magnesio ($3 \mu\text{g mL}^{-1}$). Este efecto resultó diferente al reportado por Idriss y col. [1], el cual señala una tolerancia de 50:1 para el ion calcio.

Una de las muestras conteniendo hidróxido de magnesio (M2), de matriz compleja, pudo ser analizada satisfactoriamente sin interferencia de los excipientes. Probablemente la alta dilución requerida de la muestra y la formación de MgCl_2 (disolución en medio hidroclicórico, HCl) favorecieron el resultado esperado.

La aplicación del método propuesto resultó satisfactoria, y éste podría ser tomado como una alternativa analítica simple y relativamente robusta para los que pretendan utilizar la EAM en la determinación de ion magnesio. No obstante, es importante mencionar -críticamente- que una mayor investigación es necesaria para comprobar satisfactoriamente otras aplicaciones en el campo farmacéutico.

Como perspectivas futuras, se pueden mencionar la incorporación de lantano [18] y la determinación espectrofotométrica por fluorescencia [19] para mejorar la especificidad, el límite de detección y el intervalo de trabajo. Por otra parte, el método propuesto podría ser adaptado a otros métodos que usan antraquinonas como agentes ligando con fines analíticos [15,29] u otras aplicaciones analíticas del ligando purpurina [30-34].

CONCLUSIONES

La purpurina como ligando puede ser utilizada satisfactoriamente en la determinación cuantitativa de ion magnesio mediante espectrofotometría de absorción molecular (EAM). No obstante, las metodologías que suelen utilizar antraquinonas como agentes ligando en medios acuo-orgánicos son manuales; las cuales involucran limitaciones en cuanto a las etapas preliminares del proceso analítico, entre ellas, una de invaluable importancia, como es la volatilización del disolvente. Es un hecho conocido que la técnica del análisis en flujo continuo (AFC) representa una herramienta muy importante para lograr la automatización de las etapas preliminares del proceso analítico. En el presente trabajo, la introducción del AFC permitió eliminar las limitaciones relacionadas con la volatilidad del disolvente, la dilución y la adición de la muestra y reactivos, con un grado satisfactorio de precisión, exactitud y frecuencia de muestreo.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar su agradecimiento al Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico de La Universidad de Los Andes y al Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología de la RB de Venezuela por el financiamiento concedido a través de varios proyectos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1]. Idriss KA, Sedaira H, Ahmed HM. An insight into the solution equilibria of magnesium(II) with purpurin and spectrophotometric determination of magnesium. *Talanta*. 2001; 54: 369-375.
- [2] Tarasankar P, Nikhil RJ, Pradip KD. Spectrophotometric determination of magnesium(II) with emodin (1,3,8-trihydroxy-6-methylanthraquinone). *Analyst*. 1992; 117: 791-793.
- [3] Gao HW, Yang JX, Zhou ZZ, Zhao JF. Investigation of the reaction of magnesium with p-nitro-o-carboxylazochromotropic acid and the determination of magnesium in plants and in water. *Phytochem Anal*. 2003; 14: 91-95.
- [4] Ioannou PC, Konstantlanos DG. Fluorometric determination of magnesium in serum with 2-hydroxy-1-naphthaldehyde salicyloylhydrazone. *Clin Chem*. 1989; 35: 1492-1496.
- [5] Hulanicki A, Godlewska B, Malgorzata Brzóska M. Determination of total magnesium in biological samples using electrothermal atomic absorption spectrometry. *Spectrochim Acta Part B*. 1995; 50: 1717-1724.
- [6] Abarca A, Canfranc E, Sierra I, Marina ML. A validated flame AAS method for determining magnesium in a multivitamin pharmaceutical preparation. *J Pharm Biomed Anal*. 2001; 25: 941-945.
- [7] Jodral M, Navarro M, Lopez H, Lopez M. Magnesium and calcium contents in foods from SE Spain: influencing factors and estimation of daily dietary intakes. *Sci Total Environ*. 2003; 312: 47-58.
- [8] Yu BS, Yuan QG, Nie LH, Yao SZ. Ion chromatographic determination of calcium and magnesium cations in human saliva and urine with a piezoelectric detector. *J Pharm Biomed Anal*. 2001; 25: 1027-1032.
- [9] Kallio MP, Manninen PKG. Determination of sodium, potassium, calcium and magnesium cations by capillary electrophoresis compared with ion chromatography. *Anal Chim Acta*. 1995; 314: 67-75.
- [10] Gupta VK, Chandra S, Mangla R. Magnesium-selective electrodes. *Sens Actuators B*. 2002; 86: 235-241.
- [11] Dombovari J, Becker JS, Dietze HJ. Isotope ratio measurements of magnesium and determination of magnesium concentration by reverse isotope dilution technique on small amounts of ²⁶Mg-spiked nutrient solutions with inductively coupled plasma mass spectrometry. *Int J Mass Spectrom*. 2000; 202: 231-240.
- [12] United States Pharmacopeia. 29 Ed. Rockville (Maryland): United States Pharmacopeial Convention; 2006. p 1452-1459.
- [13] Přebil R, Barnard Jr AJ, Baker JT. Recent Developments in Complexometric Titrimetry. *Crit Rev Anal Chem*. 1973; 3(2): 113-146.
- [14] AOAC International, Official Method of Analysis of AOAC International, 16th Ed. (Arlington): AOAC International; 1995.
- [15] Navas DA. Analytical applications of 1,10-antraquinones: A Review. *Talanta*. 1991; 38: 571-588.
- [16] Gmelin L, Henry Watts H. Hand-book of chemistry. Organic Chemistry Vol. VII (London): Cavendish Society; 1859. p 325-330. Available from: URL: http://books.google.co.ve/books?id=8PI4AAAAMAAJ&pg=PA325&lpg=PA325&dq=purpurin+madder-purple&source=bl&ots=0rt9ZC3F9d&sig=tPh2fqhMlfn_JcvT4E8DK7ipyQo&hl=es&ei=x8w7SuS-K6GNtgfMksT9Dw&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=1.
- [17] Idriss KA, Sedaira H, Abdel-Aziz MS, Ahmad HM. Rapid test methods for minor components analysis of hydraulic cement. Spectrophotometric determination of manganese oxide content of Portland

cement and cement raw meal. *Talanta*. 1999; 50: 913-919.

[18] Ahmad M, Narayanaswamy R. Direct fluorimetric determination of aqueous aluminium (III) with purpurin. *Science International*. 1995; 7: 351-355.

[19] Arrebola A, Gracia BM, Sánchez VM, Gázquez D. Indirect determination of total yttrium and lanthanides by flame atomic absorption measurement of magnesium after extraction of their ternary complexes with purpurin (1,2,4-trihydroxyanthraquinone) and magnesium into isobutyl methyl ketone. *J Anal Atom Spectrom*. 1998; 13: 765-768.

[20] Ramirez AA, Gazquez D, Rosa IM, Moreno F. Spectrophotometric determination of lead by extraction of the mixed-metal complex Pb(II)-Ca-purpurin (1,2,4-trihydroxyanthraquinone). *Anal Letters*. 1994; 27: 1595-1611.

[21] Mitic SS, Miletic GZ, Obradovic MV. Kinetic method for determining trace amounts of Cd(II). *J Anal Chem*. 1996; 51: 900-902.

[22] Mitic SS, Miletic GZ, Petrovic AN, Tomic SB. A kinetic determination of lysine in pharmaceutical sample. *J Serb Chem Soc*. 2002; 67: 783-792.

[23] Igov RP, Mitic VD, Pecev TG. Kinetic determination of Al(III) in solution. *J Serb Chem Soc*. 1997; 62: 371-374.

[24] Li HK, Lu X, Zhao GZ, Zhao YQ. Spectrophotometric of roxithromycin based on the charge transfer reaction between roxithromycin and purpurin. *Chin J Anal Chem*. 2003; 31: 833-835.

[25] Wongkaew M, Imyim A, Eamchan P. Extraction of heavy metal ions from leachate of cement-based stabilized waste using purpurin functionalized resin. *J Hazard Mater*. 2008; 154: 739-747.

[26] Cerdá V. Introducción a los métodos de análisis en flujo. *Islas Baleares (Palma de Mallorca)*:

Sciware; 2006. p 1-10.

[27] ICH. Harmonized Tripartite Guideline: Validation of analytical procedures: Text and Methodology. Topic Q2-B and Topic Q2-R1. London: Reproduction by Emea; 1996. p 1-15.

[28] Vosburgh WC, Cooper GR. The identification of complex ions in solutions by spectrophotometric measurements. Spectrophotometric identification of complex ions in solution. *J Am Chem Soc*. 1941; 63: 437-442.

[29] Idriss KA, Hashem EY, Abdel-Aziz MS, Ahmed, HM. Direct spectrophotometric determination of aluminium oxide in Portland cement and cement clinker. An insight into the solution equilibria and analytical aspects of the aluminium-quinizarin system. *Analyst*. 2000; 125: 221-225.

[30] Maties R, Arias JJ, Jimenez F, Román M. Spectrofluorimetric determination of aluminium in blood serum using 1,2,4-trihydroxyanthraquinone. *Anal Letters*. 1992; 25: 851-864.

[31] Maties R, Jimenez F, Román M, Arias JJ. Spectrofluorimetric determination of magnesium traces in drinking water and blood serum with 1,2,4-trihydroxyanthraquinone. *Anal Letters*. 1994; 27: 131-143.

[32] Maties R, Jimenez F, Arias JJ, Román M. Spectrofluorimetric determination of zinc with 1,2,4-trihydroxyanthraquinone in pharmaceutical preparations. *Anal Letters*. 1997; 30: 2059-2070.

[33] Maties R, Arias JJ, Jimenez F, Román M. Spectrofluorimetric determination of germanium traces using 1,2,4-trihydroxyanthraquinone. *Anal Letters*. 1997; 30: 633-644.

[34] Maties R, Arias JJ, Jimenez F, Román M. Spectrofluorimetric determination of indium with 1,2,4-trihydroxyanthraquinone. *Spectrosc Letters*. 1997; 26: 1583-1594.