

La quinina y sus posibles implicaciones toxicológicas. Análisis de aguas tónicas en España

Resumen

Fundamento: La quinina es un alcaloide presente de forma natural en la corteza de algunos árboles del género *Rubiaceae*, empleándose tradicionalmente para el tratamiento de la malaria, convulsiones y diversas infecciones. En este trabajo presentamos los resultados de muestras analizadas en España, tanto de la concentración hallada como las normas relativas a su etiquetado, así como brevemente las posibles implicaciones en la salud pública que tiene la quinina.

Método: Se ha analizado el contenido de quinina en un total de 11 muestras de diferentes fabricantes adquiridas en tiendas locales de España mediante cromatografía líquida acoplada a la detección mediante fluorescencia inducida por láser.

Resultados: El método empleado se caracteriza por su precisión, rapidez y sensibilidad. No hay una concentración homogénea de quinina en las bebidas analizadas. El etiquetado no indica el contenido en quinina.

Conclusiones: Creemos necesario una regulación más específica y mayor información para los consumidores, especialmente para ciertos grupos de riesgo.

Palabras clave: Salud pública. Quinina. Refrescos.

Summary

Background: Quinine is an alkaloid naturally occurring in the crust of some trees of genus *Rubiaceae*, traditionally used for the treatment of malaria, seizures, and various infections. In this work we present results of samples tested in Spain, both of the concentration found and labelling, as well as related to the potential implications of quinine on public health.

Methods: The content of quinine was analyzed in 11 samples of tonic waters in the Spanish market by liquid chromatography coupled through laser induced fluorescence detection.

Results: The method used is characterized by its accuracy, speed and sensitivity. Quinine concentration in beverages is not homogeneous. The labelling does not indicate the quinine content.

Conclusions: More specific regulation is needed as well as more information to consumers, especially for certain risk groups.

Key words: Public health. Quinine. Soft drinks.

Introducción

La quinina (Figura 1) es utilizada como un agente antipalúdico en el tratamiento de trastornos musculares y en diversas infecciones. Debido a sus propiedades antipiréticas, antisépticas y analgésicas; también es un componente de diversas formulaciones farmacéuticas, además de utilizarse por las industrias cosméticas y ya de forma ilegal para adulterar cocaína y heroína. Los compuestos quinolínicos son una de las familias de alcaloides más estudiada, debido a sus interesantes propiedades farmacológicas. Se extraen de la corteza de las especies *Cinchona* y *Remijia*, árboles del género *Rubiaceae*, destacando en importancia la cinchonina, cinchonidina, quinidina y quinina, representando este último un 70-90% del total¹.

El consumo más importante y extenso de quinina por la población es debido a su uso como un ingrediente de bebidas (agua tónica y similares), ya que su amargura proporciona un estímulo gustativo refrescante. Sin embargo, el empleo de quinina en dosis terapéuticas o excesivas puede causar un síndrome reversible denominado *cinchonismo*, con manifestaciones tóxicas que incluyen: trastornos gastrointestinales, visuales, auditivos, efectos cardiovasculares y neurológicos; así como cefaleas, confusión, coma, ceguera e incluso psicosis².

En términos toxicológicos, debería ser evitado su consumo por mujeres embarazadas e individuos con trastornos hepáticos³, siendo un agente sumamente tóxico en niños⁴. También se describen alergias a la quinina e incluso shocks anafilácticos tras un único consumo de agua tónica^{5,6}. Se han descrito episodios de fototoxicidad asociados al consumo de 500 ml de agua tónica^{7,8}. Tinnitus o acúfenos son también efectos peligrosos de la quinina así el consumo de agua tónica (105 mg de quinina en 1.6 l) por pilotos se cree que es el causante de accidentes de aviación⁹ que ha traído como resultado una prohibición del

Xesús Feás¹
James Robert Brašić²
Cristina A. Fente¹
Alberto Cepeda¹

¹Laboratorio de Higiene, Inspección e Control Alimentario (LHICA)

Dpto. de Química Analítica, Nutrición e Bromatología. Facultad de Veterinaria Campus de Lugo. Universidade de Santiago de Compostela.

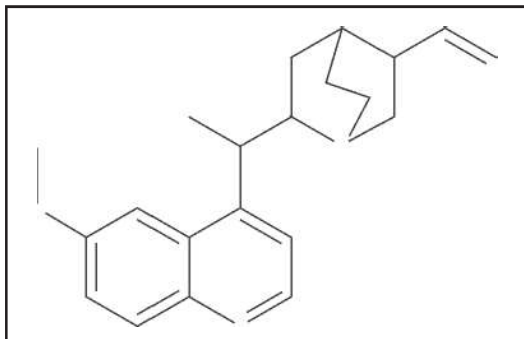
²Division of Nuclear Medicine.

The Russell H. Morgan Department of Radiology and Radiological Science. The Johns Hopkins Outpatient Center. Baltimore, Maryland. United States

Correspondencia:

Xesús Feás Sánchez
Facultade de Veterinaria.
Campus de Lugo. Universidade de Santiago de Compostela
27002 Lugo, Galiza
E-mail: xesusfeas@gmail.com

Figura 1.
Estructura química
de la quinina



consumo de esta bebida 72 h. antes de volar¹⁰. El consumo de aguas tónicas y *bitter lemon* también se ha establecido como causa de fallo renal agudo, debido a las reacciones de sensibilidad¹¹⁻¹³. Un informe especial sobre los potenciales peligros para la salud vinculado al consumo de bebidas que contienen quinina ha sido elaborado por el BfR alemán¹⁴.

En cuanto a la legislación que regula su uso alimentario, no es internacionalmente homogénea. Así, en China no se permite añadir quinina a los alimentos¹⁵. En los Estados Unidos de América su nivel en bebidas carbonatadas debe ser menor a $83 \mu\text{g l}^{-1}$ y la etiqueta llevará una declaración clara de su presencia¹⁶. En Europa, la Comisión Europea ha establecido nuevas reglas que gobiernan el etiquetado de quinina en bebidas y alimentos. Así, es necesario indicar claramente al consumidor su presencia en la lista de ingredientes, pero sin la necesidad de un mensaje de advertencia de los posibles riesgos derivados de su consumo ni su concentración¹⁷. Esta directiva se traspone al ordenamiento jurídico español con el Real Decreto 906/2003, de 11 de julio, relativo al etiquetado de los productos alimenticios que contienen quinina o cafeína¹⁸. Sin embargo, la comisión reconoce que la ingesta de quinina puede ser contraindicada para ciertos grupos de consumidores por motivos médicos o por hipersensibilidades a la sustancia. Los Estados miembros prohibieron a partir del 1 de julio de 2004 el comercio de los productos que no cumplan con esta directiva.

La determinación de quinina en refrescos, ha sido de interés para la comunidad científica, y se han propuesto varios métodos, entre los que destacan: la determinación indirecta con espectrometría de absorción atómica¹⁹, mediante sensor con transducción fluorescente²⁰, isotacoforesis con detección ultravioleta (UV) y por conductividad²¹, espectrofotometría^{22,23}, fluorimetría^{24,25}, potenciometría directa con un electrodo de membrana de poly(vinylchloride)²⁶, el uso de un sistema de flujo con optosensor y sílice

C_{18} como sustrato²⁷, voltamperometría cíclica²⁸ e inmunoensayo²⁹.

En este trabajo, presentamos los resultados hallados de la concentración de quinina en diversas muestras obtenidas en el mercado español, mediante un método simple, rápido y sensible para la determinación rutinaria de quinina en refrescos, basado en el uso de la cromatografía líquida acoplada a la detección mediante fluorescencia inducida por láser.

Métodos

Reactivos y estándares

El hemisulfato de quinina monohidratado, acesulfamato K, aspartamato, sacarina, benzoato de sodio, ácido sórbico, glucosa y ácido fosfórico fueron suministrados por Sigma (St. Louis, MO, USA). El acetonitrilo y metanol fueron adquiridos en Merck (Darmstadt, Germany). El agua deionizada y doblemente destilada fue obtenida con un sistema Millipore (Bedford, MA, USA). Todos los reactivos usados en la preparación de estándares y soluciones fueron de grado HPLC o analítico. Las soluciones madre de quinina se prepararon en agua destilada a una concentración de 100 mg ml^{-1} . Las soluciones estándar de trabajo se realizaron diariamente mediante dilución de la solución madre en agua, disolviendo cantidades apropiadas y sonicándolas.

Método analítico

El sistema analítico utilizado para determinar la concentración de quinina en las muestras analizadas ha sido descrito con detalle previamente³⁰. La separación cromatográfica se realizó en una columna Synergi Fusion-RP (50x2) mm 4 mm, con 80 \AA de tamaño de poro (Phenomenex, Torrance, CA, USA), a temperatura ambiente. La fase móvil utilizada consistió en una mezcla de metanol-acetonitrilo-acetato de amonio (45/15/40 v/v/v), filtrada y desgasificada (usando un filtro de nylon de 4 mm de diámetro y 0.45 mm de tamaño de poro) 20 min en vacío. El flujo de la fase móvil se mantuvo a 0.5 ml min^{-1} . El sistema cromatográfico fue acoplado al sistema de fluorescencia inducida por láser que consiste en un generador laser, una fuente de alimentación LC500-220RC (Melles Griot Laser Group, Carlsbad, CA, USA), y un detector ZETALIF (Picometrics, Ramonville, France). El sistema láser operó en continuo a una longitud de onda de excitación de 325 nm; una potencia de 15 mW y una potencia de excitación 8mV. Mientras que en el detector ZETALIF los parámetros de trabajo fueron: fotomultiplicador (570 Volt), potencia (10 mW) y 2

unidades relativas de fluorescencia (RFU, *Relative Fluorescence Units*). Los datos cromatográficos fueron registrados con un interfaz externo Hercule-Lite y procesados con un software de Jasco-Borwin, ambos de JMBS Developments (Le Fontanil, Francia).

La recta de calibrado fue preparada en el intervalo de 1 ng ml⁻¹ a 100 ng ml⁻¹, estimándose la relación lineal entre la concentración de quinina y el área de pico observada. El límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ) son definidos respectivamente como la señal correspondiente a tres y diez veces el ruido de fondo³¹. La reproducibilidad y repetibilidad del método fueron calculadas, definiéndose la reproducibilidad como la mayor de las desviaciones estándar (R.S.D.) para todos los niveles durante 3 días, y la repetibilidad como la mayor de las R.S.D. para la misma cantidad de quinina inyectada nueve veces.

Preparación de las muestras

Un total de 11 muestras, de diferentes fabricantes incluyendo *tonic water*, *tonic water light* y *lemon tonic water*, se adquirieron en tiendas locales de España.

Se tomó 1 ml de cada refresco en un tubo eppendorf, se desgasificó en un baño de ultrasonidos durante 5 minutos, y posteriormente se filtró a través de un filtro de 0.45 mm de tamaño de poro y 4 mm de diámetro (National Scientific Company, Duluth, GA, USA). Finalmente, 50 µl de cada muestra resultante se diluyó con exactitud hasta 250 ml con agua en un matraz aforado.

Estudios de interferencias y estabilidad

Para estudiar las posibles interferencias de aditivos comúnmente presentes en el tipo de muestras analizadas, se preparó una tónica sintética con concentraciones conocidas de cada aditivo, correspondiente al límite legalmente establecido en la Unión Europea³², disolviendo quinina (10 ng ml⁻¹), sacarina (80 mg ml⁻¹), glucosa (3%), ácido fosfórico (150 mg ml⁻¹), acesulfamato K (350 mg ml⁻¹), aspartamato (600 mg ml⁻¹) y benzoato de sodio (30 mg ml⁻¹) en agua. También se estudió la estabilidad de la quinina a temperatura ambiente (20 °C) en soluciones estándar, aguas tónicas sintéticas y muestras reales (n=6) durante un mes, cada siete días, como se describe previamente en la sección de preparación de muestras.

Resultados

En las bebidas comerciales analizadas, el etiquetado no hacía referencia a la concentración de quinina. La dilución de la muestra fue realizada con datos bibliográficos previos para trabajar dentro del intervalo de la recta de calibrado.

En el presente trabajo una sonicación para eliminar el CO₂, filtración y dilución en agua son los pasos de la preparación de la muestra. Ni una extracción líquido-líquido previa²³ con una posterior cristalización de la quinina de las bebidas²⁴, ni el uso de soluciones especiales adicionadas a la dilución de la muestra son necesarias^{20,26} en este primer paso de preparación de la muestra.

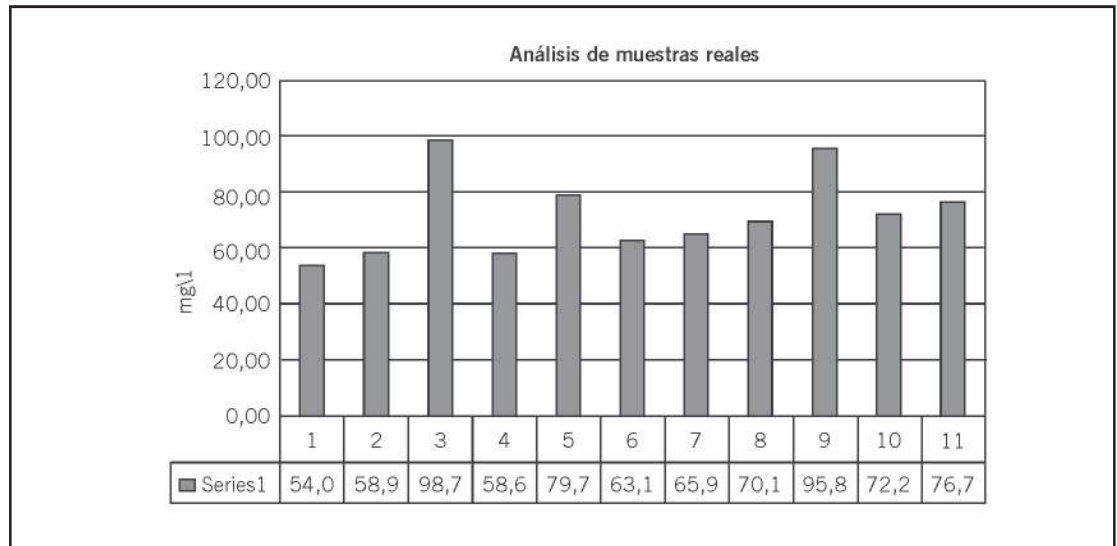
En relación a la especificidad del método, bajo las condiciones cromatográficas no se observan picos interferentes al tiempo de retención del analito de interés. El método propuesto está libre de posibles interferencias de las sustancias presentes normalmente en grandes concentraciones en refrescos comerciales.

Se estudió la estabilidad de la quinina, analizando las muestras (soluciones estándar, muestras reales y tónicas sintéticas) durante un mes cada 7 días; no observándose pérdidas en la concentración de quinina.

La linealidad del método fue determinada durante 3 días, inyectando 0.005, 0.025, 0.05, 0.2 and 0.5 ng de quinina. Se construyó una recta de calibrado en el intervalo de 1 a 100 ng ml⁻¹, repitiendo cada inyección tres veces. El área del pico observado frente a la concentración inyectada, muestran una buena linealidad ($y = 1.1074x + 0.5489$) con un coeficiente de regresión (r) de 0.9999. El bajo ruido de fondo, la precisión del equipo y la limpieza de la matriz de análisis, permiten teóricamente obtener el mismo límite de detección (señal-ruido ≥ 3) y cuantificación (señal-ruido ≥ 10) en el análisis de quinina mediante LC-LIF. Así, el LOD y LOQ fueron estimados en 3.20 pg inyectados, correspondientes a una solución de 0.64 ng ml⁻¹. La reproducibilidad, definida como la mayor de las desviaciones estándar para todos los niveles registrados en 3 días fue de 2,1%. En el caso de la repetibilidad, se procedió a la inyección de 0.05 ng de quinina (solución estándar de 10 ng ml⁻¹) nueve veces y la R.S.D. obtenida fue de 1,8%.

Los resultados de los análisis de muestras reales están resumidos en la Figura 2. Se han observado grandes diferencias en la concentración de quinina en las distintas muestras de aguas tónicas.

Figura 2.
Resultados encontrados en las muestras analizadas en España. Muestras 1 a 9 son aguas tónicas, la 10 es una lemon tonic water y la 11 una tonic water light. Las concentraciones de quinina están expresadas en $\text{mg l}^{-1} \pm \text{RSD}$ ($n=9$)



Discusión

En las bebidas comerciales analizadas, el etiquetado no hacía referencia a la concentración de quinina. Previamente al inicio de los análisis, se solicitó información a las empresas distribuidoras y fabricantes, si bien no se obtuvo ninguna respuesta positiva en este sentido, por lo que la dilución de la muestra fue realizada con datos bibliográficos previos para trabajar dentro del intervalo de la recta de calibrado.

La Directiva 2000/13/EC³³ no estipula una obligación y mención específica de la quinina en la lista de ingredientes, por ser esta un agente aromatizante. Sin embargo, la última directiva, 2002/67/EC, pone de manifiesto que cuando se utiliza quinina en la preparación de productos alimenticios, debe ser nombrado en la lista de ingredientes inmediatamente tras el término de "aromatizante". Únicamente esta directiva hace referencia a que en el mismo campo de visión de venta del producto debe aparecer un mensaje "contiene quinina" en el mismo campo de visión que el nombre del producto. Los refrescos analizados, no cumplen esta directiva, en relación al etiquetado. Creemos que es necesario que la etiqueta muestre una clara indicación de la presencia de quinina, y sería deseable una advertencia de los posibles riesgos derivados de su consumo, ya que debe ser evitado por ciertos grupos de personas con desordenes metabólicos o hipersensibilidad a la sustancia.

El nuevo método desarrollado para el control de quinina en bebidas, basado en el uso de la fluorescencia inducida por láser, se caracteriza por su precisión, rapidez y sensibilidad. Las muestras únicamente son desgasificadas, filtradas y diluidas, si bien este paso puede ser fácilmente automatizado. Los aditivos alimentarios y otros ingredientes presentes normalmente en este tipo de muestras no interfieren en el método analítico propuesto.

Los datos obtenidos muestran que no hay una concentración homogénea de quinina en las bebidas analizadas. Es posible que el consumidor adquiera dos aguas tónicas similares en composición, a priori, pero con una concentración de quinina que casi supone el doble ($54.02 \pm 0.50 \text{ mg l}^{-1}$ y $98.74 \pm 1.32 \text{ mg l}^{-1}$) una respecto a la otra. Dos de las muestras analizadas no cumplirían las normas establecidas en USA, en relación a la concentración máxima de quinina, que debe ser $\leq 83 \text{ ppm}$.

Esta amplia variación puede ser debida a que no existe una legislación específica en la Unión Europea sobre su concentración máxima permitida, y es obvio que los consumidores habituales de aguas tónicas lo hacen por su sabor amargo, ya que una mayor concentración del alcaloide produce mayor estimulación gustativa, y quizás mayor dependencia.

Creemos necesario una regulación más específica y mayor información para los consumidores, especialmente para ciertos grupos de riesgo. El etiquetado no solamente debe informar de la presencia de quinina,

si no también de su concentración y de sus potenciales riesgos para la salud.

Agradecimientos

Este trabajo es parte de la tesis doctoral: *Development of laser-induced fluorescence methods as a powerful tool for chromatographic analysis in food safety*, galardonada por el Instituto Galego de Consumo (Xunta de Galiza), como la mejor tesis doctoral de los años 2005, 2006 y 2007 en el campo de consumo. El autor también agradece la beca recibida dentro del programa "Formación de Personal Investigador" del Ministerio de Educación y Ciencia, España. Expresar agradecimientos a José Pedro Araujo, Ananias Pascoal, José Antonio Abelenda, Tobias Bister, Pablo Iglesias, Pierre Riollet y Amada Moreno-Cid por suministrarnos las muestras de bebidas, y a Ana Carreira por su colaboración técnica.

Bibliografía

- Hunter CS. Biotechnology in Agriculture and Forestry. En: Bajaj YP (eds). Springer-Verlag, Berlin. 1988;Vol. 4. Chapter 3.
- Howard MA, Terrel AB, Terrel DR, Medina PJ, Vesely SK, George JN. Quinine allergy causing acute severe systemic illness: report of four patients manifesting hematologic, renal and hepatic abnormalities. *Baylor University Medical Center Proceedings* 2003;16:21-6.
- Brašić JR. Should people with nocturnal leg cramps drink tonic water and bitter lemon?. *Psychol Rep* 1999;84:355-67.
- Langford NJ, Good AM, Laing WJ, Bateman DN. Quinine intoxications reported to the Scottish Poisons Information Bureau 1997-2002: a continuing problem. *Brit J Clin Pharmacol*. 2003;56:576-8.
- Gonzales R, Merchan R, Crespo J, Rodríguez J. Allergic urticaria from tonic water. *Allergy* 2002;57:51-2.
- Kanny G, Flabbée J, Morisset M, Moneret-Vautrin DA. Allergy to quinine and tonic water. *Eur. J. Intern. Med*. 2003;14:395-6.
- Wagner GH, Diffey BL, Ive FA. I'll have mine with a twist of lemon: quinine photosensitivity from excessive intake of tonic water. *Br J Dermatol* 1994;131:734-5.
- Tonic water-associated photosensitivity. *Nurses' Drug Alert* 1995;19:17.
- Zajtchuk JT, Mihail R, Jewell JS, Dunne MJ, Chadwick SG. Electronystagmographic findings in long-term low-dose quinine ingestion: a preliminary report. *Archiv Otolaryngol* 1984;110:788-91.
- Jung TTK, Rhee C-K, Lee CS, Park Y-S, Choi D-C. Ototoxicity of salicylate, nonsteroidal anti-inflammatory drugs, and quinine. *Otolaryng Clin N Am* 1993;26:791-810.
- Barr E, Douglas JF, Hill CM. Recurrent acute hypersensitivity to quinine. *Br Med J* 1990;301:323.
- Maguirre RB, Stroncek DF, Campbell AC. Recurrent pancytopenia, coagulopathy, and renal failure associated with multiple quinine-dependent antibodies. *Ann Intern Med* 1993;119:215-7.
- Gottschall JL, Neahring B, McFarland JG, Wu GG, Weitekamp LA, Aster RH. Quinine-induced immune thrombocytopenia with hemolytic uremic syndrome: clinical and serological findings in nine patients and review of literatura. *Am J Hematol* 1994;47:283-9.
- German Federal Institute for Risk Assessment (BfR). 2005. <http://www.bfr.bund.de/cm/208/chininhaltige%20Getraenke.pdf>
- National Standard of the People's of China. Hygienic Standards for Uses of Food Additives; GB 2760,1996.
- US Code of Federal Regulations. 2004. Title 21, Volume 3. Revised as of April 1, 2004. Cite: 21CFR172.575. US Government Printing Office: Washintong DC
- Comisión Europea 2002. Directiva 2002/67/CE de la Comisión, de 18 de julio de 2002, relativa al etiquetado de productos alimenticios que contienen quinina y productos alimenticios que contienen cafeína (DO L 192 de 19.7.2002).
- Real Decreto 906/2003, de 11 de julio, relativo al etiquetado de los productos alimenticios que contienen quinina o cafeína. BOE 166 de 12/07/2003 Sec 1 Pag. 27360.
- Yebra MC, Cespón RM. Automatic determination of quinine by atomic absorption spectrometry. *Microchem J* 2000;65:81-6.
- Ortega-Algar S, Ramos-Martos N, Molina-Díaz A. Fluorimetric flow-through sensing of quinine and quinidine. *Microchim Acta* 2004;147:211-7.
- Reijenga JC, Aben GVA, Lemmens AAG, Verheggen Th. PEM, De Bruijn CHMM, Everaerts FM. Determination of quinine in beverages, pharmaceutical preparations and urine by isotachopheresis. *J Chromatogr*. 1985;320:245-52.
- García JC, Sánchez MJ, Rodríguez MA, Díaz C. 4th Order Derivative Spectrophotometric Determination of Quinine in Soft Drinks. *Mikrochim Acta*. 1993;110:263-8.
- Rao MV, Krishnamacharyulu AG, Sattigeri VD, Manjunath MN, Nagaraja KV, Kapur O. Spectrophotometric determination of quinine in soft drinks. *J Food Sci Technol* 1984;21:266-8.
- Samanidou VF, Evaggelopoulos EN, Papadoyannis IN. Simple and Rapid HPLC Method for the Determination of Quinine in Soft Drinks Using Fluorescence Detection. *J Liq Chromatogr R T* 2004;27:2397-406.
- Chen QC, Wang J. Determination of quinine in drinks by reversed-phase ion-pair chromatography. *J Liq Chromatogr R T* 2001;24:1341-52.

26. Zareh MM, Malinowska E, Kasiura K. Plasticized poly(vinyl chloride) membrane electrode for the determination of quinine in soft drinks. *Anal Chim Acta*. 2001;447:55-61.
27. Gong Z, Zhang Z, Yang X. Optosensor for Chinchona Alkaloids With C_{18} Silica Gel as a Substrate. *Analyst* 1997;122:283-5.
28. Krause J, Umlandenze F. Quantitative Bestimmungen mittels cyclischer Voltammetrie an der Phasengrenze zweier mischbarer Elektrolytlösungen. *Fresen J Anal Chem* 1989;335:791-5.
29. Ward CM, Morgan MRA. An immunoassay for determination of quinine in soft drinks. *Food Addit Contam* 1988;5:551-61.
30. Feás X. *Development of laser-induced fluorescence methods as a powerful tool for chromatographic analysis in food safety* [tesis]. Universidade de Santiago de Compostela. 113p. Disponible en: Universidade de Santiago de Compostela, Servicio de Publicaciones, 2007.
31. US Food and Drug Administration. 2001. Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation, US Department of Health and Human Services, Center for Drug Evaluation and Research (CDER).
32. Consejo Europeo 1988. Directiva 88/107/CEE del Consejo de 21 de diciembre de 1988 relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados Miembros sobre los aditivos alimentarios autorizados en los productos alimenticios destinados al consumo humano (DO L 40 de 11.2.1989).
33. Parlamento Europeo. Directiva 2000/13/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 20 de marzo de 2000 relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros en materia de etiquetado, presentación y publicidad de los productos alimenticios (DO L 109 de 6.5.2000)..