

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Química Analítica

Grupo de investigación FQM-297 "Control Analítico
Ambiental, Bioquímico y Alimentario"



TESIS DOCTORAL

DESARROLLO DE SENSORES ÓPTICOS Y MÉTODOS SEPARATIVOS
COMO HERRAMIENTAS ACTUALES EN QUÍMICA ANALÍTICA.
COMPARACIÓN METODOLÓGICA

presentada por

Silvia Casado Terrones

para optar al grado de

Doctor en Química

Granada, 2007

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada gracias a una beca predoctoral concedida por el Ministerio de Educación y Ciencia (FPU – AP2002-1033) y a la financiación con cargo a fondos del grupo FQM-297 “Control Analítico Ambiental, Bioquímico y Alimentario” del Plan Andaluz de Investigación de la Junta de Andalucía.

**DESARROLLO DE SENSORES ÓPTICOS Y MÉTODOS SEPARATIVOS
COMO HERRAMIENTAS ACTUALES EN QUÍMICA ANALÍTICA.
COMPARACIÓN METODOLÓGICA**

por

Silvia Casado Terrones

Visado en Granada a 3 de Septiembre de 2007

Fdo: Prof. Dr. D. Alberto Fernández Gutiérrez
Catedrático del Departamento de Química Analítica
Facultad de Ciencias. Universidad de Granada

Fdo: Dr. D. Antonio Segura Carretero
Profesor Titular del Departamento de Química Analítica
Facultad de Ciencias. Universidad de Granada

Trabajo presentado para optar al grado de Doctor en Química.

Fdo: Silvia Casado Terrones

El Prof. Dr. D. ALBERTO FERNÁNDEZ GUTIÉRREZ, Catedrático del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada, y director del grupo de investigación FQM-297 "Control Analítico Ambiental, Bioquímico y Alimentario"

CERTIFICA:

Que el trabajo que se presenta en esta Tesis Doctoral bajo el título: **"DESARROLLO DE SENSORES ÓPTICOS Y MÉTODOS SEPARATIVOS COMO HERRAMIENTAS ACTUALES EN QUÍMICA ANALÍTICA. COMPARACIÓN METODOLÓGICA"**, que ha sido realizado bajo mi dirección y la del Dr. D. Antonio Segura Carretero en los laboratorios que el grupo FQM-297 tiene en el Departamento de Química Analítica y en los del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada; también, parcialmente, en el Departamento de Ingeniería Eléctrica y Electrónica de la Universidad Pública de Navarra (Pamplona), reúne todos los requisitos legales, académicos y científicos para hacer que la doctoranda D^a. Silvia Casado Terrones pueda optar al grado de Doctor en Química.

Y para que conste, expido y firmo el presente certificado en Granada a 3 de Septiembre de 2007:

Agradecimientos

Es muy difícil expresar en unas cuantas hojas la gratitud que tienes con toda esa gente que te ha acompañado durante estos años. Han sido años de aprendizaje, de esfuerzo, de trabajo y lucha, de recompensa y de satisfacción, al final y al cabo.

Los primeros a la hora de dar las gracias son los que sembraron la semilla de todo esto: mis directores, a D. Alberto Fernández Gutiérrez y D. Antonio Segura Carretero. Cuando aún estaba con clases y exámenes, me hicieron llamar una tarde, charlamos y me convencieron para iniciar esta andadura.

Alberto, tu apoyo en todo momento ha sido muy necesario para que esto haya llegado a buen puerto, siempre con la calma que te caracteriza y tu saber estar. Te estoy agradecida por haberme enseñado a trabajar bien, a esforzarme en toda empresa y a poner todo mi esfuerzo y decisión. He vivido tu amor por la docencia y la investigación todos estos años y eso ha sido un placer.

Antonio, gracias por guiarme durante toda la tesis, han sido años donde en muchos momentos estaba perdida, tanto cambio, de aquí a allá; has conseguido que no me pierda y que finalmente esté muy orgullosa de lo que hemos conseguido. Gracias a los dos, de todo corazón en esta última etapa, donde todo ha sido un poco más duro de lo normal, por vuestra paciencia y ánimo, por ayudarme a salir adelante y a superar estos últimos obstáculos, tanto científicos como personales.

Sí que es difícil dar las gracias a todos mis compañeros de la facultad, tanto de los años de carrera (Caro, Vane, Oli, Adela, Alberto, Rafa, Ester, y muchos más, sería imposible enumerarlos a todos!), como de la etapa de la tesis: Beatriz (fuiste nuestra imagen a seguir durante los años de investigación, eficiente, trabajadora, inteligente y sobre todo coherente; es una pena- y una alegría- que nos dejaras en los últimos momentos, pero sé que siempre te tengo ahí, por eso gracias!), Jordi (eres como sabes, codirector de esta Tesis, con todas las de la ley, gracias por todo el apoyo científico y humano que me has dado en estos años), Sonia (muchos buenos ratos hemos pasado, eh?. Estoy contenta de saber que en tu nueva

Agradecimientos

andadura estés tan feliz, viva la alcaldesa!), David (los malos ratos pasados eran siempre menores cuando soltabas alguno de tus comentarios; gracias por estar ahí cuando te necesité), Miguel (después de todo lo bueno que hemos vivido juntos, sólo puedo desearte la mejor de las suertes en tu vida), Alfonso (mi trabajo en el laboratorio empezó contigo de jefe, jeje, hace cuánto tiempo!. Has estado siempre pendiente de lo que pudiera necesitar, gracias cabezón!), Ana (la caravaca fue un buen fichaje, fue un placer compartir contigo ese último período en el laboratorio y fuera de él!), Maria y Rocío (pareja excepcional, lástima no haberos podido disfrutar lo que hubiera querido, sois geniales!), Antonio Luis y Ángel (poco pude compartir con vosotros, espero sigáis con ese ánimo y ganas de trabajar!). Con todos vosotros: cuántas cosas compartidas, cuántas risas, cuánto esfuerzo por que todo salga bien, cuántas horas de trabajo, diurno y nocturno... Sabéis que aunque ya no esté entre vosotros en el día a día, aunque ya no compartamos esas jornadas maratonianas, os tengo en mi cabeza. Ojalá pudiéramos vernos más a menudo, eh? pero fuera del laboratorio, por favor!

Mención especial tengo que hacer ahora a Julia (Julita), ya sabes que fuiste un fichaje tardío (siempre te lo repetimos), pero lo bueno se hace esperar. Tu capacidad de trabajo y dedicación aún me deja anonadada, y estoy muy feliz de que formes parte de mi vida de la forma en la que lo haces. Has sido y eres un gran apoyo. Gracias por estar siempre ahí, con un grito para animarme; y vaya si has tenido trabajo extra conmigo! GRACIAS. Ya mismo acabas la tesis, y verás el fruto de tanto y tanto esfuerzo; qué ilusión verte a ti ya delante del tribunal! Sabes que te quiero, sólo deseo darte las gracias por ser así y mucho ánimo con lo que queda!

También he de recordar aquí a todas esas personas con las que he compartido tantos días en ese multi-departamento, son inorgánicos, orgánicos, analíticos, una buena mezcla, al fin y al cabo: Pepe, Gonzalo, Isidora, Mari Ángeles, Jorge, Fefo, Cipri, Luis, Rafa, Ana, Carmen, Laura... a todos vosotros gracias por el día a día, y por tener siempre una palabra de ánimo conmigo.

Mi familia nunca ha llegado a entender bien qué era eso que hacía tantas horas metida en la facultad, me alegro que por fin cuando abran esta Tesis logren entenderlo. Ha sido muy necesario para poder acabar todo esto su apoyo incondicional. Gracias a mi padres, Miguel y Francisca por TODO, ellos me dieron la vida y todo lo que vino después. Gracias por su amor y comprensión en todo momento.

Gracias a mis hermanos, Miguel Ángel, Ester y Raquel, por guiarme en la vida, habéis sido para mí el camino a seguir y estoy muy orgullosa de ser vuestra hermana. Gracias aún más por haber traído a mi vida a esos cuatro seres maravillosos, mis sobrinos Ana, Julia, Rafa y Paula (como no, Isabel y Rafa, gracias a vosotros también, creo que en esto también tenéis culpa...). Nunca hubiera imaginado sentir tanta adoración por esos pequeñitos personajes. No sabéis los malos ratos que me han ayudado a superar jugando con ellos y viéndolos reír. Ojalá cuando crezcan puedan leer esto y sepan que su tita "la moderna" los ha querido desde siempre con locura.

Como no, seguro es un poco raro, pero he de dar gracias a Nana (la comedora de Picotas número 2; la primera es María), por su compañía incondicional. Gracias por esos paseos que me daba ella a mí, en lugar de yo a ella, para despejar la cabeza cada día, mañana y noche.

Gracias también a mis amigos de Porcuna: Juanfran, Ana Belén, Manuel Ángel, Manuel Carlos, Benja, Maite, Yolanda..., habéis hecho que esos ratos de descanso en el pueblo sean inolvidables. No sabéis las ganas que tengo de pasar más rato con vosotros cuando todo esto termine. Juanfran, no me puedo resistir a decirte que eres alguien muy especial en mi vida, y sé que lo sabes. Gracias por hacerme reír en cualquier momento, eres único!

Una corta (pero intensa) etapa de esta tesis la pasé en Navarra, rodeada de ingenieros electrónicos, en la Universidad de Pamplona. Conocí una ciudad increíble y una gente maravillosa. Gracias especiales a D. Ignacio Matías y Cándido Barriáin, por su dirección y cariño en el trabajo día a día.

Agradecimientos

En el laboratorio fui tratada como una reina, recuerdo con una sonrisa a David, Miguel, César, Javier, Goico, Elena, Iñaki, Santi, Patxi, y otros muchos más. Pasé allí mis primeros San Fermines, y espero que no sean los últimos!

Aprendí mucho de ellos, su visión de la ciencia era muy distinta a la mía, así que nos enriquecimos mutuamente; sentí que agradecieron mi presencia esos meses por ahí, y el pH-metro también, cuando llegué estaba violeta!! Fue una experiencia única, tanto en el terreno de la investigación como en el terreno personal. Ojalá pueda subir pronto para allá y veros de nuevo! Gracias por vuestro cariño.

Ahora toca dar las gracias a la gente con la que trabajo desde hace ya más de un año: mis compañeros de Abbott. Me siento muy afortunada de teneros día a día y de compartir tanto con vosotros: Teresa (la primera persona que conocí al entrar en Abbott: un ángel hecho persona; cuánto se aprende a tu lado! mi shati siempre buscará tu shanti...), Marta, Rosa, Celia (mis compis de arriquitau, qué buen equipo hacemos eh?, gracias por vuestro día a día), María (eres única en tu espontaneidad, franqueza, alegría, energía... no hay más palabras, ojalá te tenga cerca por mucho tiempo), Trini (con la que comparto rasgos faciales, je,je; eres un encanto, siempre atenta, dispuesta a darte lo que necesites y sonriente en cada momento, lo tienes todo! Si hubiera más gente como tú...), Emma (mi rubia canaria con la que comparto ratos inolvidables, eres mi brujita preferida!, cómo te chincho y cómo me soportas, eres una santa guayaba...), Rubén (una de esas personas con la que es imposible no estar bien: inteligente, cariñoso, divertido...), Julio (la persona más ocurrente que conozco y con el que comparto esa musiquilla especial jiennense al hablar, eaaa...), Héctor (es decir, el capaor de Abbott, gracias por la compañía en tantas horas extras y las cervezas tras esas horas). Gracias al trío (cuarteto ya) de Materiales, que me hace reír hasta la lágrima, a Ernesto y José Miguel, por soportar nuestros fríos (en verano y en invierno) y nuestro esparcimiento en el despacho, pero con una sonrisa siempre.

Mucha más gente-abbott hay por ahí a la que recordar, daros todos por aludidos: Aixa, Elena, Óscar, Jose María, Luisa, Javi,... los ratos de la comida son muy divertidos junto a vosotros!

Gracias, como no, a Juanma, que me ofreció todo su apoyo y ayuda desde el primer día para que concluyera esta Tesis. Se agradece un jefe tan cercano...

Seguro que se me olvida alguien, es que sois muchos..., gracias a todos por soportar mis quejas continuas día a día sobre lo que suponía terminar esta tesis, qué pesada he sido, no? Además de aguantarme estoicamente me habéis dado ánimos día a día. GRACIAS.

Tengo que dejar para el final las palabras de agradecimiento a esa persona que simplemente me cambió la vida, la forma de enfrentarme a cada problema y me hizo aprender tanto que no sé cómo podré devolverle todo lo bueno que me da. Esa persona se llama Alegría, y haciendo honor a su nombre, llena de luz y sonrisas cada rincón que pisa.

Tengo la suerte de considerarme parte de su familia, y por eso he podido disfrutar tanto a su lado. No conozco a persona más entregada a los demás, más entusiasta, inteligente y divertida que ella. Verdaderamente ella es la máxima responsable de que pueda ver culminada esta Tesis, ella lo sabe bien; si no la hubiera tenido a mi lado estos años de duro trabajo, seguro que hubiera abandonado!. Es genial poder tenerte siempre a mi lado, apoyándome y dándome empujoncitos cuando me siento decaída, SIEMPRE consigue animarme, no sé cómo lo hace!!

Ya sabes que eres una parte muy muy importante de mi vida, y lo sabes porque te lo repito a menudo. Estoy segura de que nos quedan tantas cosas por vivir juntas que me río nada más pensarlo!. Gracias por enseñarme a vivir con esa entrega y alegría. Gracias infinitas.

“Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado. Un esfuerzo total es una victoria completa”

Mahatma Gandhi (1869-1948)

19 ÍNDICE**23 OBJETO DE LA MEMORIA****27 PARTE A – SENSORES. Introducción****A-1. GENERALIDADES SOBRE LOS SENSORES**

1. Importancia y actualidad de los sensores (PÁG. 29)
2. Definición de sensor (PÁG. 32)
3. Componentes básicos de un sensor químico (PÁG. 35)
4. Diseño de un sensor químico (PÁG. 36)
5. Clasificación de los sensores químicos (PÁG. 38)

A-2. SENSORES ÓPTICOS

1. Generalidades de los sensores ópticos (PÁG. 42)
2. Ventajas e inconvenientes de los sensores ópticos (PÁG. 44)
3. Clasificación de los sensores ópticos (PÁG. 46)
4. Fases sensoras y mecanismos de reconocimiento (PÁG. 48)

A-3. SENSORES TIPO CÉLULA DE FLUJO (OPTOSENSORES)

1. Análisis por inyección en flujo (PÁG. 54)
2. Acoplamiento de las fases sensoras a sistemas de flujo (PÁG. 57)
3. Clasificación de los sensores de flujo (PÁG. 61)
4. Características que deben cumplir los sensores de flujo (PÁG. 62)
5. Ventajas e inconvenientes de los sensores de flujo (PÁG. 62)

A-4. SENSORES TIPO Sonda (OPTODOS)

1. Ventajas e inconvenientes de los optodos (PÁG. 65)
2. Clasificación de los optodos (PÁG. 68)

Índice

73 **CAPÍTULO 1**

Desarrollo de optosensores convencionales luminiscentes para la determinación del principio activo NFZ en colirios comerciales y la fitohormona ácido β -naftoxiacético en suelos

113 **CAPÍTULO 2**

Desarrollo de optodos para la detección de compuestos orgánicos volátiles

133 **PARTE B - TÉCNICAS SEPARATIVAS AVANZADAS**

Introducción

B-1. ELECTROFORESIS CAPILAR (CE)

1. Introducción (PÁG. 135)
2. Instrumentación en CE (PÁG. 137)
3. Principios de separación en CE (PÁG. 138)
4. Modos en CE (PÁG. 141)
 - 4.1. Electroforesis capilar en zona (PÁG. 142)
 - 4.2. Electroforesis capilar en medios micelares (PÁG. 145)
 - 4.3. Separaciones quirales (PÁG. 147)
 - 4.4. Cromatografía capilar electrocinética micelar con microemulsiones (PÁG. 148)
 - 4.5. Electroforesis capilar por afinidad (PÁG. 149)
 - 4.6. Electroforesis capilar en gel (PÁG. 150)
 - 4.7. Isoelectroenfoque capilar (PÁG. 151)
 - 4.8. Isotacoforesis capilar (PÁG. 152)
 - 4.9. Electrocromatografía capilar (PÁG. 153)
5. Detectores en CE (PÁG. 154)
 - 5.1. Absorción UV-visible (PÁG. 157)
 - 5.2. Detección fluorescente (PÁG. 159)
 - 5.2.1. Principios e instrumentación
 - 5.2.2. Modos de detección

5.3. Espectrometría de masas (PÁG. 168)

5.3.1. Principios e instrumentación

5.3.2. Ionización por electrospray

5.3.3. Analizadores de masas

6. Desarrollo de un método electroforético (PÁG. 182)

6.1. Selección del capilar (PÁG. 182)

6.2. Voltaje y corriente (PÁG. 183)

6.3. Disolución de separación (PÁG. 183)

6.4. Tipo y tiempo de inyección (PÁG. 185)

B-2. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

1. Introducción (PÁG. 187)

2. Instrumentación en HPLC (PÁG. 189)

3. Tipos de HPLC (PÁG. 191)

3.1. Cromatografía de partición o de reparto (PÁG. 193)

4. Detectores en HPLC (PÁG. 198)

5. Desarrollo de un método de HPLC (PÁG. 198)

5.1. Elución isocrática y en gradiente (PÁG. 201)

6. Semejanzas y diferencias entre CE y HPLC (PÁG. 202)

índice

207 **CAPÍTULO 3**

Detectores luminiscentes sencillos para electroforesis capilar basados en LEDs, fibra óptica y CCDs para la determinación de aminas en cerveza y de proteínas

249 **CAPÍTULO 4**

Técnicas separativas avanzadas para el análisis de residuos de antibióticos en mieles

299 **CONCLUSIONES**

305 **FE DE ERRATAS**

Objeto de la memoria

En el área de conocimiento de la Química Analítica actual existen, entre otras, dos formas de abordar algunos problemas analíticos. De una parte el desarrollo de pequeña instrumentación, versátil y barata que permita hacer medidas *in situ* y de otra el uso de grandes instrumentos separativos acoplados que permiten el análisis de muestras complejas.

El Grupo de Investigación FQM 297 (Control Analítico Ambiental, Bioquímico y Alimentario), dentro del cual se ha desarrollado la presente Tesis, ha desarrollado por un lado, una línea de investigación dedicada al desarrollo de sensores ópticos aplicables a problemas ambientales, alimentarios y farmacológicos y, por otro, una línea dedicada al uso de técnicas separativas, tanto electroforesis capilar (CE) como cromatografía líquida (HPLC), acopladas a diferentes sistemas de detección, especialmente DAD, luminiscentes y espectrometría de masas, para el análisis de muestras complejas.

El objetivo que se planteó en esta Tesis Doctoral fue el conseguir resultados útiles, determinando analitos de interés, en estas dos líneas que permitieran alcanzar, al tiempo, una extensa formación en ambas para la doctoranda. Por estas razones, la presente Memoria se planificó dedicando una parte a sensores ópticos desde un punto de vista analítico y, otra, a técnicas separativas, CE y HPLC.

Dentro de la primera línea se pensó en desarrollar optosensores convencionales luminiscentes para la determinación del principio activo nafazolina y de una fitohormona interesante como es el ácido β -naftoxiacético en suelos y un optodo para la determinación de compuestos orgánicos volátiles.

Dentro de la segunda línea planteamos la posibilidad, por su interés en otros proyectos, de utilizar nuevos detectores luminiscentes sencillos para EC basados en LEDs, fibra óptica y CCDs para la determinación de aminas en

Objeto Memoria

cerveza y de proteínas y, también, el uso de la CE y el HPLC-DAD y/o MS para el análisis de residuos de antibióticos en mieles.

PARTE A

SENSORES

A-1. Generalidades sobre los Sensores

1. Importancia y actualidad de los sensores

El desarrollo de sensores químicos ha sido y es muy importante en campos tan variados como el de las Ciencias de la Salud, el ambiental y el industrial.

En el campo de la Química Analítica Clínica¹⁻³, la posibilidad de miniaturización de los sensores ha dado muy buenos resultados, llegando a desarrollarse dispositivos muy económicos (desechables o reutilizables) que pueden ser separados del módulo principal.

En el campo del control ambiental⁴⁻⁶, el empleo de sensores constituye una herramienta muy útil en la identificación y cuantificación de contaminantes de forma remota y continua, dando información muy valiosa a la hora de llevar a cabo una estrategia adecuada para remediar los efectos de la contaminación en áreas contaminadas o en zonas con desechos peligrosos para la vida.

También se ha producido un importante incremento en la demanda de automatización en procesos industriales^{7,8}. Las medidas de parámetros

¹ Kolle C., Gruber W., Trettnak W., Biebnernik K., Dolezal C., Reiningger F., O'leary P., *Fast optochemical sensor for continuous monitoring of oxygen in breath-gas analysis*, Sens & Actuators B 38, 141 (1997).

² Elamari A., Gisin N., Muñoz J.L., Poitry S., Tsacopoulos M., Zbinden H., *Photon-counting optical-fiber sensor for the detection of ammonia in neurochemical applications*, Sens & Actuators B 38, 183 (1997).

³ Barone P.W., Parker R.S., Strano M.S., *In vivo fluorescence detection of glucose using a single-walled carbon nanotube optical sensor: Design, fluorophore properties, advantages, and disadvantages*, Anal. Chem. 77, 7556 (2005).

⁴ Seitz W.R. en Wolfbeis O.S. (Ed.), *Fibre optic chemical sensors and biosensors*. Vol. II, CRC Press, pág. 1 (1991).

⁵ Rogers K.R., Lin J.N., *Biosensor for environmental monitoring*, Biosensors Bioelectron, 7, 317 (1992).

⁶ Fernández Sánchez J.F., *Desarrollo de optosensores fluorescentes para la determinación de principios activos farmacológicos y contaminantes ambientales en muestras reales*. Tesis Doctoral, Universidad de Granada (2003).

⁷ Bourgeois W., Gardey G., Servieres M., Stuetz R.M., *A chemical sensor array based system for protecting wastewater treatment plants*, Sens & Actuators B 91, 109 (2003).

químicos son necesarias para seguir y controlar un proceso. Así, en la Química Analítica de procesos, los métodos para el análisis *on line* están basados en la disponibilidad de sensores químicos. Las demandas más importantes en la industria en cuanto a las características de los sensores son precio, robustez, estabilidad con el tiempo o con la temperatura, además de cumplir con una biocompatibilidad en procesos biotecnológicos.

Los llamados paquetes inteligentes (Intelligent Packaging)⁹ surgen como respuesta a las demandas cada vez más exigentes de los consumidores sobre los alimentos, con cada vez menos conservantes, con requerimientos legales cada vez más estrictos, en un mercado cada vez más globalizado y preocupado por la seguridad alimentaria y con la reciente amenaza del bioterrorismo en los alimentos¹⁰⁻¹². Los paquetes inteligentes se pueden definir como sistemas que controlan las condiciones de los alimentos empacados para dar información sobre la calidad de esos alimentos durante su transporte y almacenaje. En este sentido, el desarrollo de sistemas sensores que determinen la calidad de los alimentos en términos de frescura, deterioro microbiano u oxidación, se ha convertido en una tarea muy importante en la industria alimentaria. Las aplicaciones de los paquetes inteligentes en sistemas de trazabilidad y Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPC-HACCP) también se han puesto de manifiesto.

El empleo de sensores químicos en todos estos campos puede dar lugar a resultados cuantitativos o semicuantitativos rápidos, en la propia matriz de la muestra, es decir, "in situ", reduciendo los costes de transporte y material de laboratorio, pues se minimiza el número de muestras requeridas en comparación con las necesidades para su análisis en el laboratorio,

⁸ Riza N.A., Arcin M.A., Pérez F., *Harsh environmental minimally invasive optical sensor using free-space targeted single-crystal silicon carbide*, IEEE Sensors Journal 6, 672 (2006).

⁹ De Jong R.A., Boumans H., Slaghek T., Van Veen J., Rijk R., Van Zandvoort M., *Active and intelligent packaging for food: is it the future?*, Food Additives and Contaminants 22, 975 (2005).

¹⁰ Kerry J.P., O'Grady M.N., Hogan S.A., *Past, current and potential utilisation of active and intelligent packaging systems for meat and muscle-based products: a review*, Meat Science, 74, 113 (2006).

¹¹ De Jong A.R., Boumans H., Slaghek T. Van Veen J., Rijk R., Van Zandvoort M., *Active and intelligent packaging for food: is it the future?*, Food Additives and Contaminants, 22, 975 (2005).

¹² Yam K.L., Takhistov P.T., Miltz J., *Intelligent packaging: concepts and applications*, Journal of Food Science, 70, R1 (2005).

empleando los métodos clásicos para su confirmación. Además, la posibilidad de obtener medidas a tiempo real hace que su mayor campo de aplicación sea en aquellas situaciones en las que la muestra no se pueda llevar fácilmente al laboratorio y para análisis de rutina.

Los sensores químicos permiten realizar tres tipos de análisis que son aplicables al control analítico, dependiendo de las necesidades y que son: control continuo en línea a tiempo real (monitorización), control "alarma" regular y control ocasional discreto o al azar.

Hemos de resaltar que el éxito final de un sensor químico es su comercialización y venta, y para ello sus características de robustez, selectividad, sensibilidad, linealidad, inmunidad e interferencia y ausencia de efectos de matriz deben ser elevadas para poder competir con los análisis clásicos de laboratorio.

Después de aproximadamente dos décadas de investigación en la tecnología de los sensores, la mayor parte de los esfuerzos han dado como resultado únicamente curiosidades científicas en las universidades y en los institutos de investigación. En el presente, muy poco de la tecnología de sensores, y en particular de los sensores ópticos, comparada con los cientos de diseños existentes, ha sido convertida en productos comerciales.

Varios son los obstáculos para la comercialización de sensores. En primer lugar, características tales como sensibilidad, intervalo lineal, reproducibilidad y estabilidad demostradas para los sensores a nivel de laboratorio no son lo suficientemente cercanas a las necesidades del usuario. Además, aún cuando se logren valores óptimos, estas características se reducen drásticamente durante los distintos pasos en el desarrollo y producción en masa de un sensor. Por lo tanto, es importante realizar diseños con características químicas y físicas simples, que permitan el uso de tecnologías ya desarrolladas tanto como sea posible.

El segundo obstáculo es la necesidad de desarrollar sistemas integrados y de interfases. En el concepto de sensor es necesario tener en cuenta un paso posterior en el diseño de prototipos, y es que deben ser fácilmente utilizables por usuarios no habituales.

El tercer obstáculo concierne a la competitividad del campo de los sensores. La comercialización se torna difícil o imposible si no se defienden las verdaderas ventajas que éstos tienen sobre sus competidores basados en tecnologías ya desarrolladas y probadas.

Y por último, probablemente el factor más importante responsable de la lenta comercialización de sensores se debe al tipo de mercado al que va dirigido. Debido a la complejidad de estos sistemas, deben invertirse millones de euros para su desarrollo y, por lo tanto, hasta que no se hagan visibles los beneficios de estos mercados, las compañías privadas no estarán motivadas para investigar y transferir la tecnología de los sensores a la producción en cadena. Sin embargo, varios de los mercados en los que el desarrollo de sensores puede desempeñar un papel realmente importante son en el campo del Análisis Clínico y en varios sectores de la Química Analítica industrial, tales como controles medioambientales, análisis de control en la cadena de producción y desarrollo de paquetes inteligentes.

2. Definición de sensor

De forma general, se puede denominar "sensor" a cualquier dispositivo robusto, de uso sencillo y preferiblemente portátil, capaz de transformar (transducir) la magnitud de un fenómeno cuya identificación resulta de interés en una señal física medible, proporcionando de forma directa y continua información de su entorno¹³. Estos dispositivos se pueden dividir en dos grupos en función de que detecten cambios en parámetros físicos (presión, temperatura, etc.) o bien parámetros químicos (pH, concentración

¹³ Janata J., Bezegh A., *Chemical Sensors*, Anal. Chem. 60, R62 (1988).

de oxígeno, etc.). Los sensores físicos son sensores capaces de cuantificar fenómenos físicos y a los diseñados para medir especies (bio)químicas se les conoce como sensores (bio)químicos.

Resulta difícil dar una definición exacta y universal de lo que es un sensor químico. Según Roe y *col.*¹⁴ un “sensor químico ideal” es un dispositivo capaz de detectar y/o cuantificar a tiempo real una especie química en un medio complejo (muestra de interés) a través de una interacción química selectiva.

La IUPAC propone otra definición según la cual un sensor químico es un dispositivo que transforma información química, variando desde la concentración de un componente específico de la muestra hasta el análisis total de su composición, en una señal analítica útil. La información química puede venir originada de una reacción química del analito o de una propiedad física del sistema investigado. Además, el sensor puede contener dispositivos que tengan las siguientes funciones: toma de muestra, transporte de muestra y procesamiento de señal y datos¹⁵.

Idealmente, un sensor químico debe operar de forma continua y reversible, directamente sobre la matriz de la muestra y debe tener la capacidad de proporcionar información sobre la distribución espacial y temporal de una especie molecular o iónica a tiempo real¹⁶. Otras condiciones que idealmente debería cumplir un sensor son las de ser portátil además de ser barato, tener mínimo mantenimiento y ser fácil de usar.

De hecho, el principal objetivo que se persigue con un sensor ideal es integrar dos de los tres pasos generales del proceso analítico (véase Figura A-1).

¹⁴ Roe J.N., Szoka F.C., Verkman A.S., *Fiber optic sensor for the determination of potassium using fluorescence energy-transfer*, *Analyst* 115, 353 (1990).

¹⁵ Hulanicki A., Glab S., Ingman F., *Chemical Sensors, definitions and classification*, *Pure & Appl. Chem.* 63, 1247 (1991).

¹⁶ Valcárcel M., Luque de Castro M.D. *Flow-through (bio)chemical sensors*. Elsevier (1994).

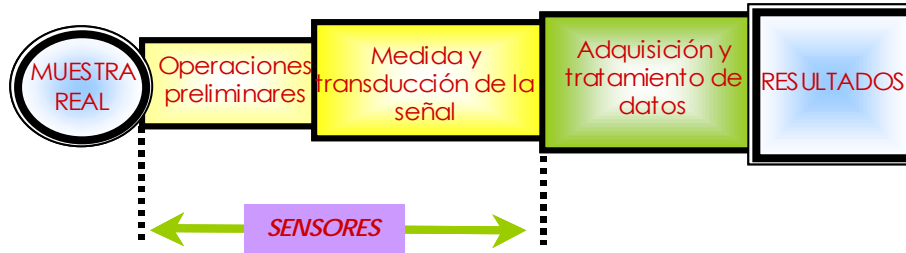


FIGURA A-1. Importancia de los sensores en el proceso analítico

Las prestaciones de un sensor son derivadas de criterios analíticos generales así como de requerimientos específicos como son la estabilidad a largo plazo, miniaturización, estabilidad mecánica, tiempo de respuesta, estabilidad con el tiempo, compatibilidad con la presión, temperatura, explosividad, radiactividad, condiciones biológicas y esterilización.

Sin embargo, muy pocos sensores cumplen todas las anteriores especificaciones de forma estricta. De hecho, numerosos autores denominan también sensores a ciertos diseños que no son capaces de medir de forma continua la concentración de ciertas especies, es decir, que son irreversibles y sólo permiten una determinación. En este caso, hablamos de sensores "desechables o de un solo uso"¹³.

En determinadas ocasiones puede ocurrir que el sensor no sea lo suficientemente selectivo; en este caso, puede ser de gran ayuda la incorporación de alguna técnica simple de pretratamiento en línea con la detección, para separar el analito de las especies interferentes presentes en la muestra¹⁷.

Así pues, en sentido amplio, podríamos acabar definiendo un sensor como cualquier dispositivo de uso sencillo que sea para los instrumentos de

¹⁷ Cammann K., *Continuous pollution-control by chemical sensors*, Sens & Actuators B 6, 19 (1992).

medida lo que los sentidos son para los seres vivos¹⁸, es decir, un sistema que proporcione una determinada respuesta a un estímulo exterior, respuesta que posteriormente es analizada y procesada.

3. Componentes básicos de un sensor químico

Un sensor químico capaz de informar sobre una especie química consta básicamente de tres partes^{15,19} (véase Figura A-2):

1. Zona de reconocimiento o receptor: en la cual se produce la interacción selectiva con el analito (o analitos) de interés, lo que origina un cambio del sistema cuya magnitud está relacionada con la concentración de la especie a determinar.

El receptor puede basarse en diferentes principios:

- *principio físico:* no se produce reacción química. Ejemplos típicos son aquellos basados en medidas de absorbancia, luminiscencia, índice de refracción, conductividad, temperatura, cambio de masa, etc.
- *principio químico:* una reacción química donde participa el analito genera la señal analítica.
- *principio bioquímico:* un proceso bioquímico es la fuente que genera la señal analítica. Ejemplos típicos son los sensores potenciométricos microbianos o los inmunosensores. Como hemos dicho anteriormente, éstos se consideran un subgrupo de los sensores químicos, son los llamados biosensores.

En ocasiones no es posible decidir inequívocamente si un sensor opera según un principio químico o físico; en algunos casos se da un proceso mixto: reacción química y principio físico medido. Este es, por ejemplo, el caso en el que la señal se deba a un proceso de adsorción.

¹⁸ Pereiro R., *Estudio de nuevas fases sólidas reactivas para sensores ópticos de elementos de interés biomédico: análisis de aluminio y potasio*. Tesis Doctoral, Universidad de Oviedo (1991).

¹⁹ Janata, J., *Principles of chemical sensors*, CRC Press. Boca Raton, FL, vol. 1 (1991).

2. Transductor: donde se transforma la energía que lleva la información química de la muestra en una señal analítica útil (se genera una señal óptica, eléctrica, etc.). El transductor, como tal, no muestra selectividad.

3. Elemento electrónico: de tratamiento y medida de señales eléctricas y que muestra los resultados.

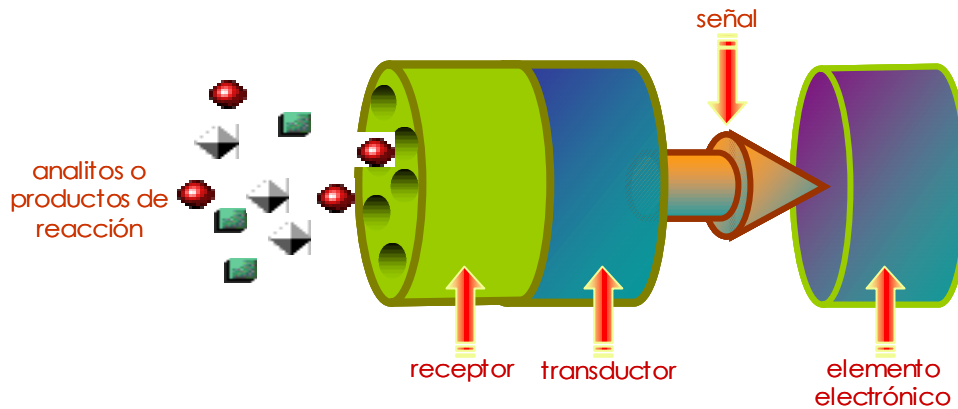


FIGURA A-2. Partes de un sensor químico

La magnitud de la señal física obtenida se relaciona posteriormente con la concentración de analito a través de una curva de calibrado realizada previamente.

En resumen, un sensor consiste en una capa sensible o sistema de reconocimiento (receptor), un transductor para convertir la información química en una señal eléctrica y/o óptica y una electrónica para la evaluación de datos y aporte de resultados, normalmente integrada en el sensor.

4. Diseño de un sensor químico

Los pasos básicos a seguir en el diseño de un sensor²⁰ para resolver un problema analítico particular están esquematizados en la Figura A-3.

²⁰ Sadik O.A., VanEmon J.M., *Designing immunosensors for environmental monitoring*, Chemtech 27, 38 (1997).

Las consideraciones prácticas de mayor importancia a tener en cuenta en el diseño de un sensor son:

- ▲ **Mecanismo de reconocimiento.** La fase sensora debe reconocer la especie a determinar a través de una interacción fácilmente detectable y cuya magnitud sea función de la concentración del analito.
- ▲ **Inmovilización del reactivo.** Existen diferentes métodos (adsorción pasiva, entrecruzamiento, enlace covalente, iónico, etc.) con sus ventajas e inconvenientes. Debe tenerse en cuenta que dicha inmovilización puede alterar profundamente las características del analito en disolución.
- ▲ **Transductores.** Según se midan cambios en alguna propiedad eléctrica, óptica, cambios de masa, etc., como consecuencia del reconocimiento, se puede hablar de transductores electroquímicos, ópticos, piezoeléctricos, etc.

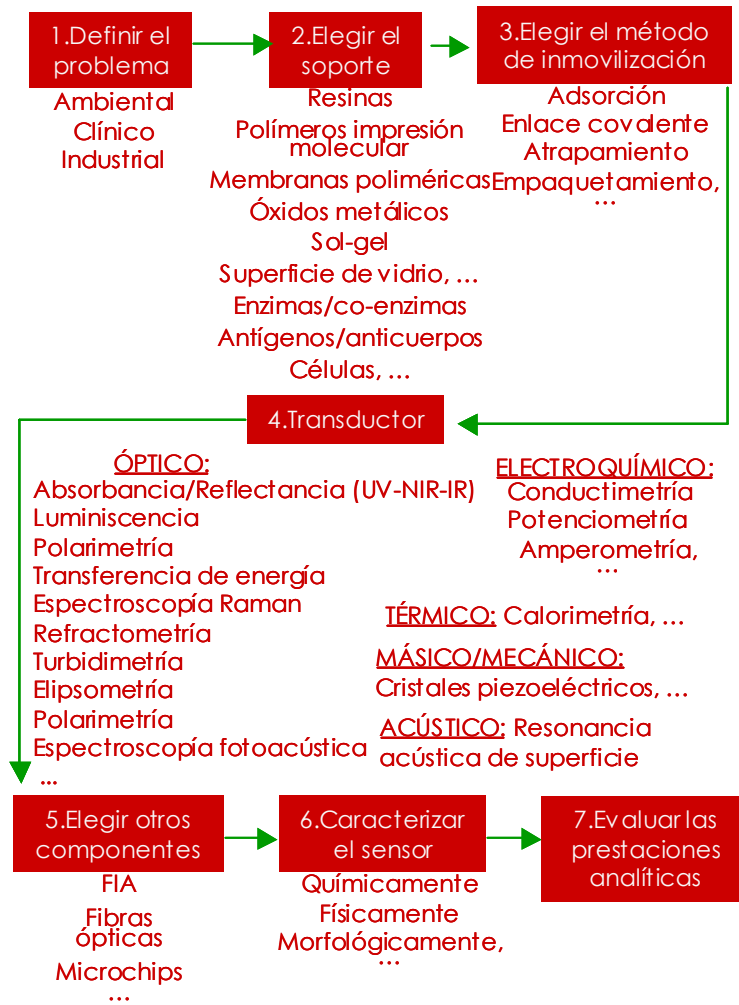


FIGURA A-3. Pasos a seguir en el diseño de un sensor químico

5. Clasificación de los sensores químicos

Se pueden establecer diferentes clasificaciones de los sensores utilizando diversos criterios. El gran interés que existe actualmente en el mundo de los sensores hace que éstos se encuentren evolucionando continuamente y por tanto, es seguro que irán apareciendo otras clasificaciones a medida que se desarrollen nuevos tipos de sensores. Los criterios más utilizados y la

clasificación de sensores correspondientes a cada criterio son los siguientes²¹:

- Atendiendo al modo de reconocimiento, los sensores pueden clasificarse en *sensores químicos o bioquímicos*. Cuando la etapa de reconocimiento se lleva a cabo mediante un elemento sensible biológico (por ejemplo una enzima, un anticuerpo, una célula, etc.) el dispositivo resultante es conocido como biosensor. Así pues, la diferencia entre un sensor químico y un biosensor está en la reacción (química o biológica) de reconocimiento del analito. Los sensores (bio)químicos han sido ampliamente utilizados para aplicaciones ambientales, clínicas, biológicas e industriales.
- De acuerdo con la naturaleza de la interacción medible los sensores se pueden clasificar en *reversibles e irreversibles*.
- Según su forma externa en *sensores tipo célula de flujo, tipo sonda o tipo microchip*.
- En función de la relación entre la zona de reconocimiento y el transductor, en *sensores conectados o integrados*.
- Teniendo en cuenta el modo de operación en *sensores de medidas discretas (sensores tipo sonda) o de medidas de flujo (optosensores)*.
- Considerando el número de especies a determinar en *sensores simples o múltiples*, (monoparamétricos y multiparamétricos, respectivamente).
- Atendiendo a la naturaleza de la señal física que se genera y se mide, es decir, atendiendo al tipo de transductor, los sensores químicos se han venido clasificando en *sensores electroquímicos, ópticos, térmicos, piezoeléctricos, etc.*^{16,22}.

Esta última clasificación, basada en la naturaleza de la señal que se genera o mide, es bastante general y es la más ampliamente establecida.

²¹ Costa Fernández J.M., Sanz Medel A. en Fernández Gutiérrez A. y Schulman S.G. (Eds.), *Fosforescencia molecular analítica: una aproximación práctica*. Editorial Universidad de Granada (2001).

²² Edmonds T.E. (Ed.), *Chemical Sensors*. Blackie & Son, UK (1988).

Por ello, se procede a describir de una forma más pormenorizada esta clasificación.

- Los sensores **electroquímicos** miden cambios en alguna propiedad eléctrica del sistema y ese cambio producido en las magnitudes eléctricas es proporcional a la concentración de analito. Así existen sensores conductimétricos, potenciométricos, amperométricos, impedimétricos e ISFETs (transistores de efecto de campo).
- Los sensores **ópticos** son aquellos en los que se producen cambios en alguna propiedad óptica del sistema: transmitancia, transfectancia, optotérmicos, reflexión interna atenuada (ATR), cambio de índice de refracción, reflectancia (UV, NIR, IR), fluorescencia y fosforescencia (intensidad y tiempo de vida), transferencia de energía, “quenching”, espectroscopía Raman, refractometría, turbidimetría, elipsometría, polarimetría o espectroscopia fotoacústica.
- Los sensores **térmicos** miden calores de reacción o cambios en la temperatura del sistema.
- Y los **piezoeléctricos** cuantifican cambios de masa, de viscosidad, etc.

También se han desarrollado otros sensores, aunque en menor medida, que utilizan otros tipos de detección, pudiendo citar: los de ondas acústicas de superficie y los magnéticos, en donde se utilizan medidas de paramagnetismo.

No existe, pues, un principio universal para el desarrollo de un sensor, ya que cada caso requiere una adaptación específica de un principio de medida. Una visión general de los principios básicos para el desarrollo de sensores se puede ver en la Tabla A-1.

TABLA A-1. Principios de funcionamiento o tipos de sensor

<i>Principio de funcionamiento</i>	<i>Tipo de sensor</i>
Cambio en la conductividad	Óxidos de metales semiconductores Semiconductores orgánicos
Cambio en el potencial	Electrodos selectivos de iones Sensores de gases en estado sólido Transistores de efecto de campo
Cambio de intensidad de corriente	Sensores amperométricos (electrodos de oxígeno y enzimas, inmunosensores, sonda de gases en estado sólido)
Cambio de la frecuencia de resonancia	Cristales piezoeléctricos resonantes
Cambio de propiedades ópticas	Transmisión/absorción, dispersión, reflectancia, fluorescencia, fosforescencia, refracción, tiempo de decaimiento, polarización
Efectos térmicos	Sensores térmicos y calorimétricos

A-2. Sensores Ópticos

1. Generalidades de los sensores ópticos

Los sensores ópticos se basan en la utilización de zonas de reconocimiento o fases sensoras químicamente activas y su implementación en dispositivos de medida. La interacción del analito a determinar con la fase sensora provoca un cambio en sus propiedades ópticas que es proporcional a la concentración del analito, cambio que es registrado y medido por los dispositivos de medida.

La importancia y el potencial de los sensores químicos han ido en aumento durante los últimos años. Los primeros trabajos desarrollados sobre sensores para especies químicas se enfocaron desde una perspectiva electroquímica. No obstante, el gran volumen de conocimiento de que se dispone hoy día sobre métodos óptico-espectroscópicos y las amplias posibilidades que los mismos ofrecen, han dado lugar a la búsqueda e investigación en el campo de los sensores con detección óptica-espectroscópica^{23,24}.

La espectroscopía de emisión luminiscente ha desarrollado métodos caracterizados por su sensibilidad, selectividad y versatilidad; la industria de las telecomunicaciones ha logrado la comercialización de fibras ópticas de bajo coste que permiten transmitir luz y cubrir así largas distancias; se encuentran disponibles nuevas fuentes de radiación como láseres y diodos fotoemisivos (LEDs)²⁵ que permiten la excitación del analito prácticamente en todo el intervalo de longitudes de onda de la región visible; se han desarrollado fotodiodos y CCDs de bajo costo; y por último, nuevos métodos quimiométricos junto con microprocesadores de alta capacidad y pequeño

²³ Seitz W.R., *Chemical sensors based on fibre optics*, Anal. Chem. 56, A 16 (1984).

²⁴ Wolfbeis O.S. (Ed.), *Fiber optic chemical sensors and biosensors*. CRC Press, Boca Raton, FL, Vol I (1991).

²⁵ Ballantine D.S., Callahan D., Maclay G.J., Stetter J.R., *An optical wave-guide acid vapor sensor*, Talanta 39, 1657 (1992).

tamaño permiten almacenar y procesar datos, aún en el caso de relaciones complejas de señal-concentración.

Así, la conjunción de las excelentes propiedades que ofrecen las fibras ópticas como vías de transmisión de luz a través de grandes distancias, el desarrollo instrumental en el campo de la fotónica (láseres, LEDs, fotodiodos, CCDs, etc.), la aparición en el mercado de dispositivos baratos y de pequeñas dimensiones, los avances en computación (microprocesadores, redes neuronales, etc.), junto con la abundante información química cuantitativa y cualitativa que se puede obtener mediante técnicas analíticas espectroscópicas han llevado, en las últimas décadas, a un desarrollo espectacular de los sensores ópticos para el análisis y/o control de parámetros de interés químico, ambiental, clínico, etc.

Una de las ventajas que ofrecen los sensores ópticos es que para unir la zona de reconocimiento con los dispositivos de medida se pueden usar fibras ópticas.

Podemos afirmar, por lo tanto, que el uso de fibras ópticas permite "acercar el espectrómetro a la muestra", mientras que el empleo de fases sensoras inmovilizadas permite llevar a cabo medidas en la propia muestra, "in situ".

Pero en los últimos años han aparecido sensores ópticos en los que no es necesaria la utilización de fibras ópticas, son los basados en el uso de microchip²⁶⁻²⁹. En este caso, la fase sensora es inmovilizada directamente sobre el transductor o en un soporte inerte que se encuentra unido al mismo y que está integrado en el microchip donde están instalados la fuente de

²⁶ Takabayashi Y., Uemoto M., Aoki K., Odake T., Korenaga T., *Development and optimization of a lab-on-a-chip device for the measurement of trace nitrogen dioxide gas in the atmosphere*, Analyst 131, 573 (2006).

²⁷ Cottier K., Wiki M., Voirin G., Gao H., Kunz R.E., *Label-free highly sensitive detection of (small) molecules by wavelength interrogation of integrated optical chips*, Sens. & Actuators B 91, 241 (2003).

²⁸ Nezel T., Spichiger-Keller U.E., Ludin C., Hensel A., *Gas-selective optical sensors for fire detectors*, Chimia 55, 725 (2001).

²⁹ Schult K., Katerkamp A., Trau D., Grawe F., Cammann K., Meusel M., *Disposable optical sensor chip for medical diagnosis: new ways in bioanalysis*, Anal. Chem. 71, 5430 (1999).

excitación y el sistema de detección. De tal forma, la respuesta del sensor es equivalente a los desarrollados haciendo uso de la fibra óptica pero simplificando su diseño y disminuyendo el tamaño.

2. Ventajas e inconvenientes de los sensores ópticos

En general, se puede decir que hay un elevado número de ventajas inherentes a los sensores ópticos que aconsejan el uso de los mismos frente a otros tipos de sensores, particularmente los electroquímicos, sin que esto quiera decir que se menosprecien las importantes aplicaciones de éstos. Estas ventajas son:

- ✓ La señal óptica no está sujeta a interferencias eléctricas.
- ✓ No se requiere un sistema de referencia.
- ✓ No hay consumo significativo de analito por parte de la fase sensora, por lo que la muestra queda inalterada tras la medida.
- ✓ La fase activa no necesita estar en contacto con el sistema óptico. Esto simplifica extraordinariamente el desarrollo de sensores en los que la fase activa debe ser sustituida o reemplazada, lo cual resulta necesario cuando se desarrollan fases basadas en reactivos con vida limitada o en sensores de un solo uso (desechables).
- ✓ En algunos casos, utilizando un discriminador adecuado, es posible acoplar distintas fases ópticamente activas a un único sistema de transducción, lo cual da lugar a una importante disminución del costo y resulta una ventaja económicamente clara, pues es posible la realización del análisis rápido de diversos analitos con un mismo equipo.
- ✓ Son susceptibles también, de ser miniaturizados, permitiendo el desarrollo de sensores de fibra óptica o microchips muy pequeños y flexibles.

- ✓ Ofrecen la posibilidad de resoluciones a varias longitudes de onda e información temporal, pudiéndose aplicar también a técnicas de tiempo resuelto^{30,31}.
- ✓ Es posible desarrollar sensores ópticos para analitos que no pueden ser determinados por técnicas electroquímicas.
- ✓ En determinadas aplicaciones, como a la hora de realizar medidas biomédicas "in vivo", los sensores ópticos son más seguros, evitándose el riesgo de un "shock" eléctrico.
- ✓ Algunos sensores ópticos pueden trabajar en intervalos de temperatura extremos lo que hace posible su esterilización a temperaturas elevadas.
- ✓ Parte de los sensores ópticos pueden ser esterilizados usando rayos gamma, lo que hace posible su utilización en biotecnología.
- ✓ Cuando se emplean sistemas de fibra óptica, es posible transmitir señales ópticas a grandes distancias, lo que permite realizar análisis en ambientes peligrosos (en ambientes radiactivos, en atmósferas contaminadas, a altas temperaturas o presiones, etc.) sin necesidad de recurrir previamente a la realización de la toma de muestra.

Sin embargo, los sensores ópticos también presentan algunas desventajas, tales como:

- ✗ La luz ambiental puede interferir en las medidas.
- ✗ La estabilidad temporal del sensor puede no ser elevada debido a la fotodescomposición de los reactivos usados.
- ✗ Los tiempos de respuesta pueden ser grandes, sobre todo en los casos en los que estén involucrados fenómenos de transferencia de masa.
- ✗ En general, los sensores ópticos presentan intervalos lineales menores que los electroquímicos.

³⁰ Plant R.L., Burns D.H., *Quantitative, depth-resolved imaging of oxygen concentration by phosphorescence lifetime measurement*, Appl. Spectr. 47, 1594 (1993).

³¹ Gewehr P.M., Delpy D.T., *Optical oxygen sensor based on phosphorescence lifetime quenching and employing a polymer immobilized metalloporphyrin probe. 1. Theory and instrumentation*, Med. & Biol. Eng. & Comp. 31, 2 (1993).

- ✘ Y en muchos casos, existe una carencia de reactivos selectivos y que interaccionen reversiblemente con el analito. Además, habitualmente hay una pérdida de sensibilidad tras su inmovilización.

Estos problemas explican, en parte, la falta de éxito comercial hasta la fecha de los sensores ópticos y animan a un esfuerzo investigador continuado y ligado al trabajo conjunto de varias áreas³².

3. Clasificación de los sensores ópticos

Son numerosas las clasificaciones propuestas de los sensores ópticos atendiendo a diversos aspectos²¹:

⊙ **Según la naturaleza de la interacción con el analito**, se habla de sensores ópticos *reversibles*, cuando la interacción química del analito con la zona de reconocimiento del sensor es reversible; o sensores ópticos *irreversibles*, cuando la interacción es irreversible. Estos últimos se dividen, a su vez, en regenerables o reutilizables, siempre y cuando puedan volver a ser utilizados tras un tratamiento determinado; y no regenerables o desechables cuando resultan irrecuperables al realizar la medida y por tanto son de un solo uso.

⊙ **Según su morfología**, los sensores ópticos pueden dividirse en tres amplios grupos:

- Sensores tipo Célula de Flujo (**optosensores**). En este caso el sólido ópticamente activo se encuentra empaquetado en una célula de flujo que puede estar situada en el compartimiento de muestra del equipo o en el exterior del mismo (en este caso será preciso utilizar fibras ópticas que permitan el transporte de la luz hasta el lugar de la medida).
- Sensores tipo sonda (**optodos**). Estos sensores están constituidos por una fase ópticamente activa situada en una guía de ondas, bien de

³² Wolfbeis O.S., *Fluorescence optical sensors in analytical-chemistry*, Trends Anal. Chem. 4, 184 (1985).

morfología cilíndrica (fibra óptica) o bien de cualquier otra (por ejemplo, plana).

- Sensores tipo **microchip**. En ellos, la fase sensora se inmoviliza directamente sobre el transductor o sobre un soporte inerte que se alberga en un microchip que dispone de todo lo necesario para llevar a cabo la medida.

Los optodos y los sensores tipo microchip permiten su empleo tanto en discontinuo como en flujo, sin embargo los optosensores sólo se pueden emplear en sistemas de flujo.

⊙ **Según la naturaleza del fenómeno óptico medido**, se puede hablar de sensores de absorbanza, luminiscentes (fluorescentes, fosforescentes, quimioluminiscentes, bioluminiscentes), etc.

En los sensores de absorbanza la relación entre la intensidad de la luz incidente y la luz reflejada están en directa relación con la concentración del analito a determinar. Estos sensores son sencillos y robustos, pero poco selectivos.

Dentro de los distintos mecanismos de transducción, los procesos fotoluminiscentes resultan particularmente atractivos para el desarrollo de sensores ópticos, ya que la radiación detectada puede ser diferenciada de la radiación incidente sobre la fase activa por su longitud de onda. Además, dan lugar a sistemas sensores altamente sensibles que permiten determinar muy bajos niveles de concentración. Estas características hacen especialmente adecuado el uso de dichas técnicas fotoluminiscentes como técnicas de detección en el desarrollo de sensores químicos.

De las dos técnicas analíticas derivadas del fenómeno fotoluminiscente, la fluorimetría y la fosforimetría, la fluorimetría ha sido tradicionalmente la técnica empleada en el desarrollo de sensores ópticos luminiscentes. Sin embargo, es mucho menor el número de sensores fosforescentes a

temperatura ambiente existentes. Esto se debe al escaso número de moléculas disponibles capaces de desarrollar fosforescencia. No obstante, en los últimos años la fosforescencia está cobrando cada vez más importancia como método de detección por las ventajas que presenta sobre la fluorescencia en el desarrollo de los sensores ópticos²¹:

- ✓ Es posible desarrollar instrumentación sencilla, empleando componentes electrónicos de bajo coste que permitan la medida de tiempos de vida de fosforescencia; todo esto está permitido por los largos tiempos de vida del estado triplete.
- ✓ Debido a que las posibles interferencias de emisiones fluorescentes residuales o luz dispersa pueden ser evitadas (usando un tiempo de demora adecuado tras la excitación con fuentes pulsadas), es posible obtener relaciones señal/ruido elevadas.
- ✓ La gran separación existente entre las longitudes de onda de excitación y emisión fosforescente hace que la discriminación entre ellas sea más fácil mediante el uso de sistemas de selección espectral de bajo coste.
- ✓ Se obtienen sistemas más selectivos, ya que la fosforescencia es un fenómeno mucho menos común que la fluorescencia.

Existen, sin embargo, algunas desventajas fundamentales:

- ✗ Se limita el uso de este sistema de detección fosforescente puesto que existen pocas moléculas que presenten emisión fosforescente.
- ✗ Será necesario desoxigenar las muestras para poder observar la emisión fosforescente del analito, ya que el oxígeno es un desactivante muy eficaz de la fosforescencia.

4. Fases sensoras y mecanismos de reconocimiento

Todos estos tipos de sensores tienen una parte esencial en común para que pueda tener lugar el reconocimiento y detección del analito: la **fase sensora o zona de reconocimiento óptico**. Ésta puede ser una membrana polimérica en la que pueden ser solubilizados diferentes reactivos que

interaccionen con el analito de interés produciendo un cambio en las propiedades ópticas de la misma³³; un óxido metálico o un sol-gel nanoestructurado en el que se inmovilice un reactivo que actúe de la misma forma que la descrita en el caso anterior³⁴; una resina comercial en la que los analitos se adsorben en su superficie y van preconcentrándose aumentando así la emisión luminiscente³⁵; o un polímero de impronta molecular en el que se hayan generado huecos específicos para el analito y dentro del cual, puedan preconcentrarse, permitiendo así su detección óptica³⁶.

El **mecanismo de reconocimiento óptico** va a depender, por tanto, del tipo de fase sensora que se diseñe. Así, los principales mecanismos de reconocimiento de los sensores ópticos son los siguientes:

1. *Mecanismo de coextracción o cambio iónico.* La fase sensora contiene un ionóforo (que interacciona con el analito), un cromoionóforo (cuyas propiedades ópticas serán sensibles al pH del medio) y un aditivo aniónico lipofílico encargado de mantener la electroneutralidad dentro de la membrana. La interacción del analito de interés con el ionóforo provoca la entrada de iones H^+ (coextracción) que modifican el pH de la membrana o la cesión de H^+ del ionóforo al cromoionóforo (cambio iónico) que, al igual que en el caso anterior, produce un cambio de pH de la membrana. Esta variación del pH induce un cambio en las propiedades ópticas del cromoionóforo, cambio que se relaciona con la concentración del

³³ Fernández-Sánchez J.F., Cannas R., Spichiger S., Steiger R., Spichiger-Keller U.E., *Novel nanostructured materials to develop oxygen-sensitive films for optical sensors*, Anal. Chim. Acta 566, 271 (2006).

³⁴ Fernández-Sánchez J.F., Fernández I., Steiger R., Beer R., Cannas R., Spichiger-Keller U.E., *A second generation of metal-oxide, nanostructured matrices to increase the thermo-stability of CO and NO₂ sensing layers based on phthalocyaninato-iron (II): NMR and photophysical studies*, Adv. Funct. Mater. 17, 1188 (2007).

³⁵ Salinas-Castillo A., Fernández-Sánchez J.F., Segura-Carretero A., Fernández-Gutiérrez A., *Solid-surface phosphorescence characterization of polycyclic aromatic hydrocarbons and selective determination of benzo(a)pyrene in water samples*, Anal. Chim. Acta 550, 53 (2005).

³⁶ Sánchez-Barragán I., Costa-Fernández J.M., Pereiro R., Sanz-Medel A., Salinas A., Segura A., Fernández-Gutiérrez A., Ballesteros A., González J.M., *Molecularly imprinted polymers based on iodinated monomers for selective room temperature phosphorescence optosensing of fluoranthene in water*, Anal. Chem. 77, 7005 (2005).

analito de interés. Por tanto, es un mecanismo de reconocimiento indirecto.

2. *Mecanismo de interacción directa analito-cromoionóforo.* La fase sensora contiene un cromoionóforo que tras interactuar con el analito de interés (interacción física o química) cambia alguna de sus propiedades ópticas. Esta variación puede ser un aumento o una disminución de dicha propiedad, por ejemplo, desactivación de luminiscencia, que es proporcional a la concentración de analito.
3. *Mecanismo de interacción directa analito-soporte.* La membrana, que no contiene ningún aditivo ópticamente activo, interactúa con el analito que se retiene por interacciones físicas y/o químicas, preconcentrándose y produciendo una variación en las propiedades ópticas de la fase sensora que es proporcional a la concentración de analito. Este es el caso de fases sensoras basadas en resinas comerciales o polímeros de impronta molecular.

Para el desarrollo de los optosensores de la presente memoria han sido objeto de estudio las siguientes quince **resinas comerciales**:

➔ *Polímeros de intercambio iónico o resinas de tipo iónico:*

a) Resinas de poliestireno-divinilbenceno (PS-DVB):

α-1) Catiónicas: *Dowex 50w* (50wx2, 50wx4, 50wx8) (Ver Figura A-4 b)

En éstas, el grupo ionogénico que las convierte en catiónicas es el sulfonato (SO_3^-).

α-2) Aniónicas: *Dowex 1* (1x2, 1x4, 1x8) (Ver Figura A-4 c)

El grupo iónico en este caso es $\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{Cl}^-$.

La nomenclatura xn a continuación del nombre comercial de la resina, siendo n un número que varía entre 1 y 32, indica el porcentaje en peso de DVB añadido a la mezcla inicial de copolimerización y es un índice del grado de entrecruzamiento entre los monómeros de estireno y DVB.

b) Resinas con matriz de dextrano (polímero de glucosa) entrecruzado con glicerina, *Sephadex*:

b-1) Catiónicas:

SP-Sephadex, que contiene grupos sulfopropilo ($O(CH_2)_3SO_3^- H^+$).

CM-Sephadex, con grupos carboximetilo (OCH_2COOH).

b-2) Aniónicas:

QAE-Sephadex, conteniendo grupos dietil(2-hidroxiopropil)aminoetilo.

DEAE-Sephadex, con grupos dietilaminoetilo.

➔ *Polímeros no-iónicos o resinas neutras:*

a) *Gel de Sílica* (Davisil, Merck), con matrices de sílice.

b) *Amberlita XAD* (2, 4 y 7) (Ver Figura A-1 a y d).

Aunque las tres tengan similar nombre comercial hay gran diferencia entre ellas. Las XAD 2 y 4 están formadas bajo una matriz de estireno y DVB, pero con distinto grado de entrecruzamiento; mientras que la XAD 7 posee una matriz de polimetacrilato.

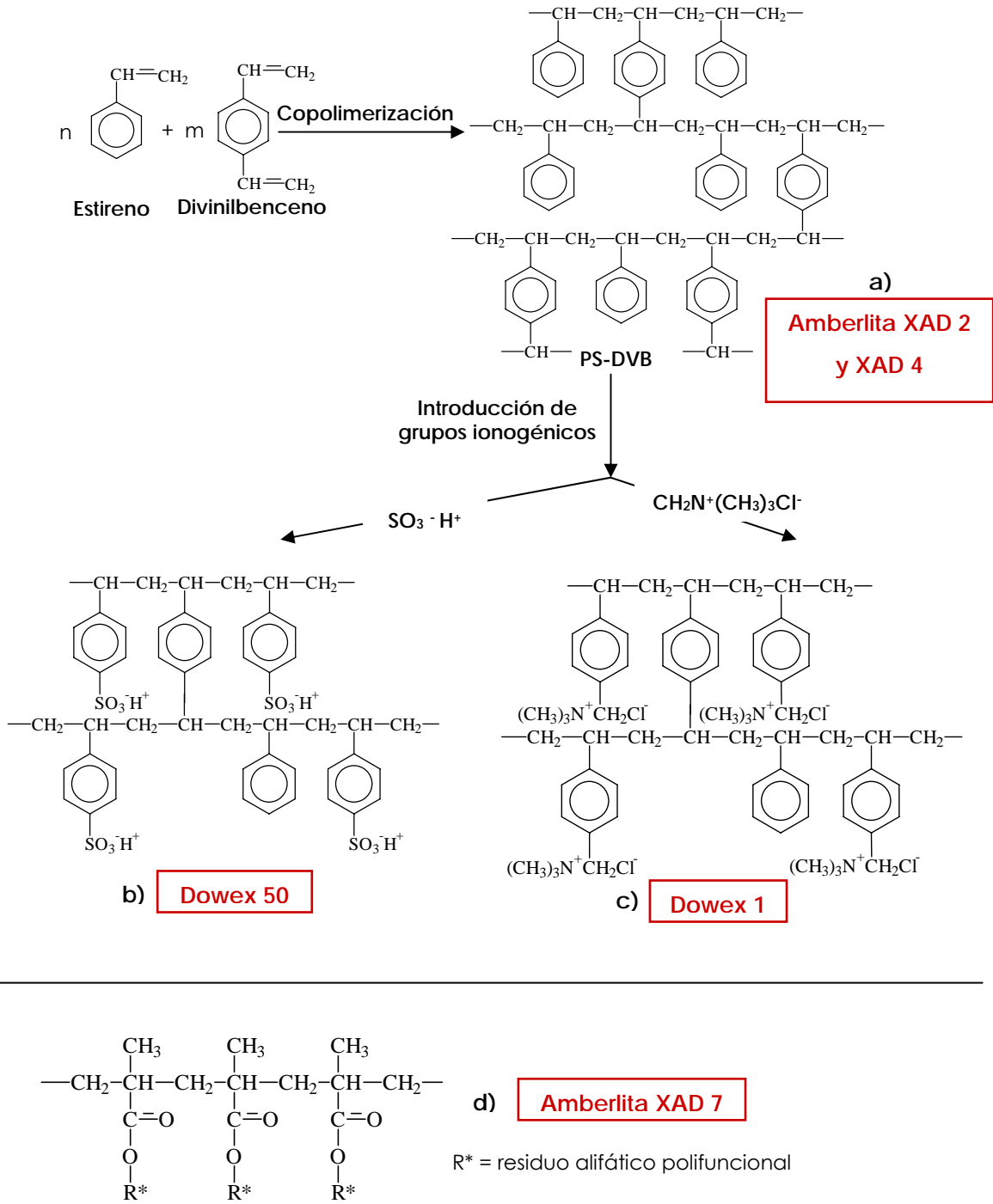


FIGURA A-4. Estructura de las resinas XAD y Dowex

Como en la presente memoria se han desarrollado varios optosensores (cuya fase sensora es una resina comercial) y optodos (usando como fase sensora membranas poliméricas) se procederá a hacer una descripción más profunda de ambos tipos de sistemas sensores.

A-3. Sensores tipo Célula de Flujo (Optosensores)

Un sistema analítico convencional de flujo continuo comprende tres etapas: la transferencia de masa (analito) entre dos fases, las reacciones (bio)químicas y la detección continua en una celda de flujo convencional¹⁶.

El dispositivo que realice simultáneamente la detección con la reacción y la separación en la celda de flujo puede considerarse formalmente como un optosensor, pues reúne sus cuatro características principales (responde directa, reversible, continua y rápidamente a variaciones en la concentración del analito de interés) de los sensores. Este término fue introducido por Ruzicka y Hansen³⁷ para definir un nuevo principio de detección en análisis por inyección en flujo basado en el cambio de las propiedades ópticas de una superficie activa situada en el paso de un flujo.

La realización simultánea de la etapa de retención del analito y del proceso de detección óptica en un sistema de análisis por inyección en flujo (FIA) constituye una vía de amplias posibilidades para la superación de muchos inconvenientes de los sensores ópticos^{38,39}.

1. Análisis por inyección en flujo

Una metodología con las características de las técnicas FIA ofrece numerosas ventajas analíticas, entre las que se puede citar⁴⁰: fundamento sencillo, equipamiento de bajo costo, bajo consumo de muestra y reactivos, elevada frecuencia de muestreo y fácil automatización. El FIA se engloba dentro de los métodos cinéticos y por tanto presenta en general una mayor

³⁷ Ruzicka J., Hansen E.H., *Optosensing at active surfaces – a new detection principle in flow-injection analysis*, Anal. Chim. Acta 173, 3 (1985).

³⁸ Ruzicka J., Christian G.D., *Reversible optosensing in packed flow-through detectors – flow-injection or chromatography?*, Anal. Chim. Acta 234, 31 (1990).

³⁹ Ruzicka J., Marshall G.D., *Sequential injection – a new concept for chemical sensors, process analysis and laboratory assays*, Anal. Chim. Acta 237, 329 (1990).

⁴⁰ Valcárcel M. y Luque de Castro M.D. *Análisis por Inyección en Flujo*. Editorial Universidad Córdoba / Monte de Piedad y Caja de Ahorros de Córdoba (1984).

selectividad que las correspondientes técnicas manuales. La exactitud y la precisión son realmente sorprendentes a pesar de que se basa en medidas de sistemas en estado transitorio.

La técnica FIA consiste básicamente en una inyección o inserción directa de la muestra líquida en un flujo continuo y no segmentado. De este modo, la muestra es arrastrada a través del flujo del sistema, pudiendo tener lugar uno o varios procesos adicionales entre ésta y el fluido portador. La sustancia a analizar se hace pasar por un detector apropiado que permite realizar medidas en continuo, originando una señal transitoria que está relacionada con la concentración de la especie de interés. El grado de dispersión de la muestra es altamente reproducible estando controlado por factores tales como la velocidad de flujo, el diseño geométrico del sistema y la longitud y diámetro de los tubos.

Las condiciones experimentales de trabajo habitual en FIA originan una mezcla incompleta del bolo de muestra inyectado en el flujo portador. De ahí, que una característica fundamental de esta metodología sea que el tiempo de operación ha de ser muy reproducible por efectuarse las medidas en condiciones de no equilibrio. El tratamiento profundo de esta temática está ampliamente documentado en la bibliografía^{16,40}.

Finalmente, es de recalcar la casi universalidad del FIA dado que su carácter modular lo hace sencillo de adaptar a cualquier necesidad analítica concreta. Sin lugar a dudas, el gran desarrollo actual de esta técnica se debe a su excepcional versatilidad. Este tipo de sistema en flujo puede ser utilizado con éxito en el análisis de rutina de un laboratorio.

Un sistema FIA ordinario está constituido por al menos cuatro partes esenciales (Figura A-5):

- Unidad de propulsión, que impulsa un gas inerte o un portador a lo largo del sistema. Generalmente es una bomba peristáltica.

- Sistema de inyección, por donde se introduce la muestra. Generalmente es una válvula de cuatro o seis vías.
- Zona de reacción, donde puede o no existir alguna reacción adicional.
- Sistema de detección, donde se encuentra la célula de flujo.

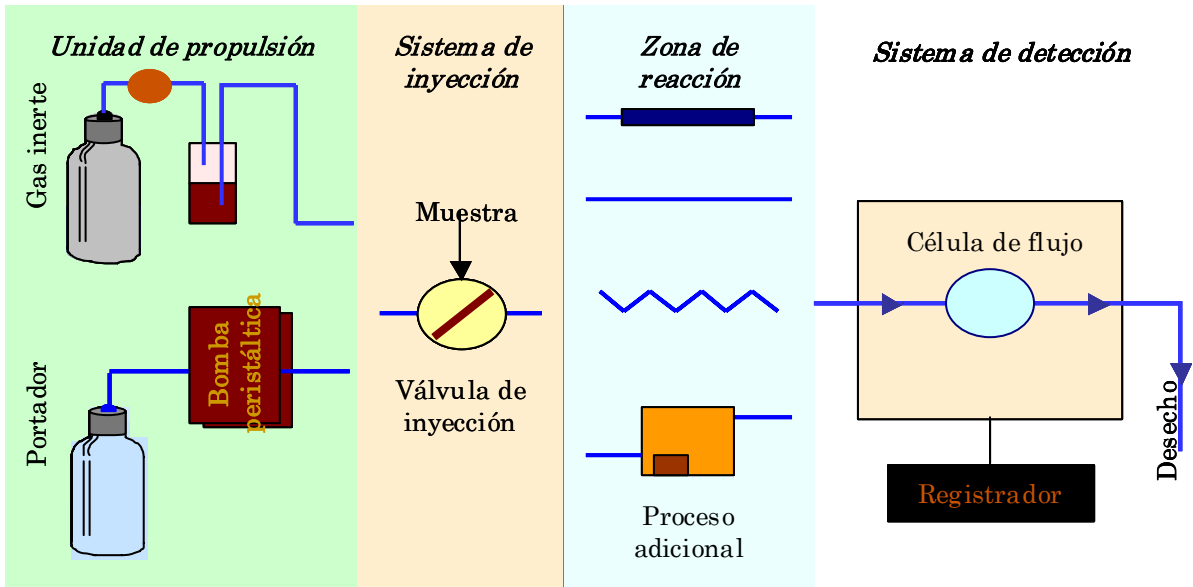


FIGURA A-5. Esquema general de un sistema FIA

El sistema FIA utilizado en la presente memoria tiene una serie de particularidades y está constituido por una bomba peristáltica que impulsa a una disolución portadora, una válvula de inyección de muestra, una válvula de regeneración y un sistema de detección, que para optosensores convencionales es una cubeta de flujo situada en el compartimento de muestra del espectroluminómetro (Figura A-6).

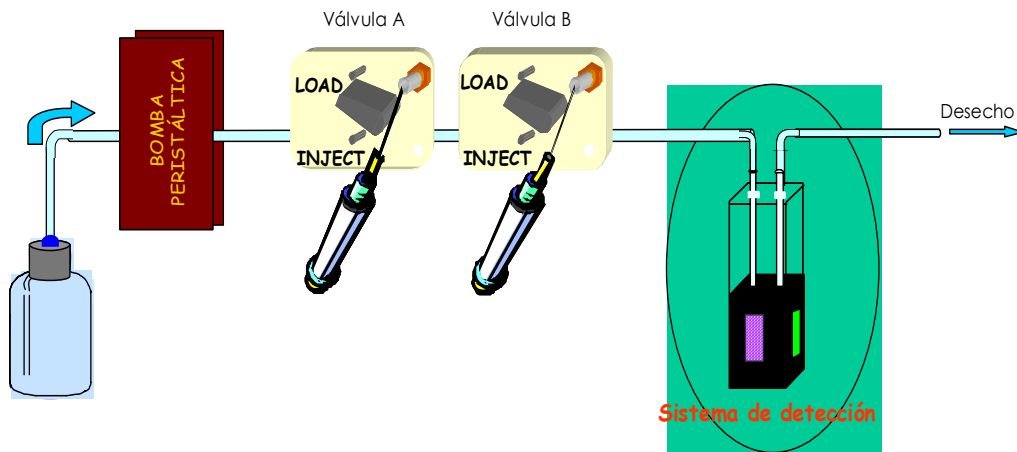


FIGURA A-6. Esquema del sistema FIA empleado

2. Acoplamiento de las fases sensoras a sistemas de flujo

Una de las características más relevantes de los sensores tipo célula de flujo es su total compatibilidad con sistemas FIA. Por lo que a las características intrínsecas de los sistemas de inyección en flujo (automatización, flexibilidad, acondicionamiento y calibrados de muestra sencillos, desarrollo previo de reacciones químicas, etc.) se suman las de la utilización de fases sensoras (selectividad, preconcentración del analito, etc.) que hacen posible su aplicación a muestras reales de todo tipo¹⁶.

El acoplamiento con sistemas FIA puede ofrecer soluciones a algunos de los problemas de los sensores ópticos, tales como largos tiempos de respuesta marcados por lentos procesos de difusión del analito desde la muestra a la fase activa, que limitan la utilidad práctica de éstos. Así, los tiempos de respuesta pueden ser reducidos al incorporar un pequeño bolo de muestra en el flujo portador que va a interactuar con la fase sensora de forma transitoria. De igual manera, el tiempo de exposición se puede utilizar para realizar una discriminación cinética entre el analito y otras sustancias interferentes cuando éstas posean una velocidad de difusión diferente. Otro de los grandes aportes de estos sistemas FIA es su facilidad

para acoplar un sistema de regeneración de la fase sensora en el caso de irreversibilidad en la reacción de reconocimiento, de una forma simple y automática¹⁶.

El empleo de fases sólidas para la detección en un sistema FIA ofrece, en principio, dos ventajas inherentes (propias del equilibrio heterogéneo líquido-sólido) cuando se compara con la utilización más convencional de fases líquidas que contienen el reactivo^{41,42}:

1. La transferencia de masa radial en un reactor empaquetado es mucho más intensa que en un reactor hueco y, por tanto, la contribución de la difusión radial en el equilibrio sólido-líquido dentro del bloque es más eficaz.
2. El equilibrio líquido-sólido también tiene lugar en aquellos elementos de la muestra donde no hay dispersión, debido a que el mismo procede exclusivamente de la interfase sólido/líquido.

Las principales ventajas de tipo práctico que se pueden conseguir al introducir interfases sólidas en sistemas de análisis en flujo, son las siguientes¹⁶:

- ① **Aumento de la sensibilidad** utilizando fases sólidas, ya que la sensibilidad de los sistemas de análisis en flujo puede incrementarse por:

- ★ *Preconcentración en línea o "in situ"*; es uno de los métodos más eficaces para aumentar la sensibilidad. Físicamente, la preconcentración puede conseguirse acoplando en el sistema en flujo una unidad adecuada de separación como puede ser una microcolumna con un relleno adecuado. Si la fase sólida se dispone en la célula de flujo de un detector óptico no destructivo se consigue un sistema particular de preconcentración "in situ", que integra los procesos de

⁴¹ Ruzicka J., Hansen E.H. *Homogeneous and heterogeneous system - flow-injection analysis today and tomorrow*, *Anal. Chim. Acta* 214, 1 (1988).

⁴² Valcárcel M. y Luque de Castro M.D. *Non-Chromatographic Continuous Separation Techniques*. Royal Society of Chemistry. Inglaterra (1991).

retención y detección⁴³, y esto es lo que ocurre en los optosensores.

- ★ *Disminución de la dilución*: históricamente, los primeros reactores sólidos utilizados en FIA fueron de naturaleza redox y de esta forma se evita la dilución correspondiente al empleo de un reductor adicional⁴⁴.
- ★ *Aumento de la estabilidad de los reactivos*: las enzimas inmovilizadas sobre soportes adecuados suelen ser más estables que en disolución y se han utilizado ampliamente en sistemas de análisis en flujo tanto para determinar sustratos^{45,46} como actividades enzimáticas⁴⁷.

- ② **Aumento de la selectividad** utilizando fases sólidas. Los métodos FIA son más selectivos que sus homólogos manuales puesto que al realizar las medidas sin llegar a condiciones de equilibrio se eliminan interferencias de especies que reaccionen más lentamente que el analito⁴⁸.

La señal que se recoge en las medidas realizadas con los optosensores queda reflejada en lo que se denomina fiagrama (Figura A-7): registro de la intensidad relativa de fluorescencia (I.R.F.) o fosforescencia (I.R.P.) en función del tiempo.

⁴³ Luque de Castro M.D., Valcárcel M., *Integration of separation and detection in continuous-flow systems*, Trends Anal. Chem. 10, 114 (1991).

⁴⁴ Van Staden J.F., Joubert A.E., Van Vliet H.R., *Flow-injection determination of nitrate in natural waters with copper - cadmium and copperized cadmium tubes in the reaction manifold system*, Fresenius Z. Anal. Chem. 325, 150 (1986).

⁴⁵ Ruz J., Lázaro F., Luque de Castro M.D., *Immobilized enzymes in flow-injection analysis - present and trends*, J. Autom. Chem. 10, 15 (1988).

⁴⁶ Hansen E.H., *Flow-injection enzymatic assays*, Anal. Chim. Acta 216, 257 (1989).

⁴⁷ Fernández Romero J.M., Luque de Castro M.D., *Flow-injection configurations for enzyme activity determination*, Chim. Oggi., Noviembre 17 (1998).

⁴⁸ Valcárcel M., Ríos A., *Selectivity in analytical-chemistry*, Analisis 18, 469 (1990).

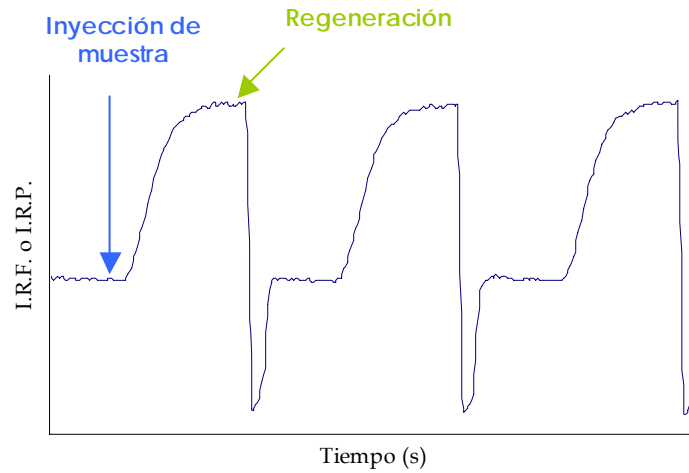


FIGURA A-7. *Figrama típico*

La línea base o de fondo se consigue inyectando disolución portadora. Una vez estabilizada la señal, se inyecta la muestra. Cuando ésta llega a la fase sensora se produce en todos los casos un aumento de la I.R.F./ I.R.P. hasta llegar a un máximo. Si el sistema no es autoregenerable hay que inyectar un regenerante para que la línea base vuelva a su valor inicial.

Así, se establece la intensidad relativa de fluorescencia (I.R.F.) y la intensidad relativa de fosforescencia (I.R.P.) como la cantidad de luz, en unidades arbitrarias, que llega al detector del luminómetro. Por otro lado, se ha establecido la *respuesta del optosensor* como la diferencia entre la I.R.F. o I.R.P. obtenida cuando el analito está soportado sobre la fase sensora (señal) y la I.R.F. o I.R.P. obtenida por la dispersión de la luz de la resina (ruido). Por último, el *tiempo de respuesta del optosensor* es el tiempo que transcurre desde que se inyecta el analito hasta que se obtiene la mayor señal (Figura A-8).

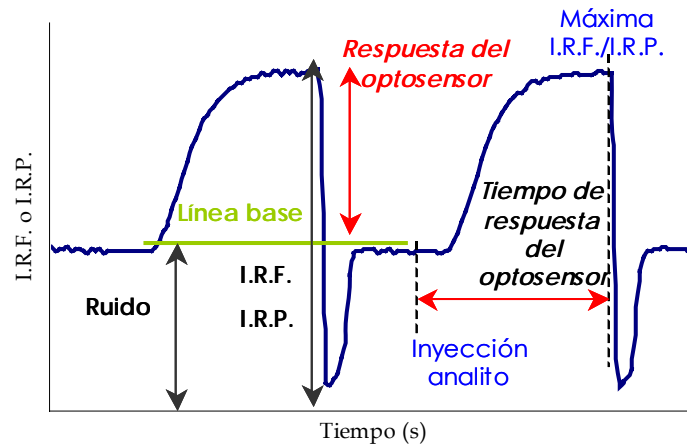


FIGURA A-8. Definición de los parámetros asociados a un diagrama típico

3. Clasificación de los sensores de flujo

De acuerdo con la localización de la zona de reconocimiento, donde tiene lugar la reacción, separación y detección, podemos clasificar los sensores de flujo en dos tipos básicos²¹ (ver Figura A-9):

- **Optosensor convencional**, donde la zona de reconocimiento está incorporada dentro de una célula de flujo especial que se encuentra en el compartimento de muestra del instrumento. Por ello, además del sistema de flujo sólo es necesario un luminómetro convencional para llevar a cabo las medidas.
- **Optosensores no convencionales**, donde la zona de reconocimiento está incorporada dentro de una célula de flujo que se sitúa fuera del instrumento. Para ello hay que usar fibra óptica para transportar la luz excitatriz desde el instrumento a la fase sensora y recolectar la emisión luminiscente, o bien se usa un microchip que albergue la fuente de excitación y el sistema de detección.

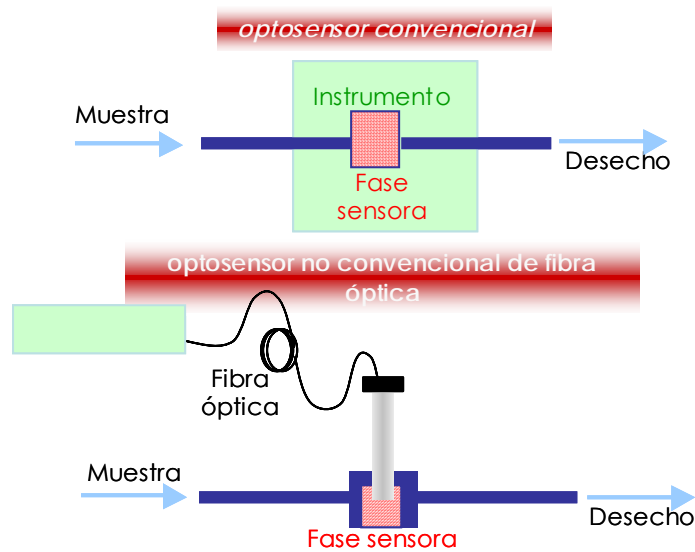


FIGURA A-9. Tipos básicos de sensores de flujo

4. Características que deben cumplir los sensores de flujo

Los optosensores deben reunir una serie de características necesarias para un adecuado funcionamiento:

- ✦ El sistema debe ser reversible (o fácilmente regenerable si es irreversible).
- ✦ La cinética de los procesos que tengan lugar debe ser rápida.
- ✦ La fase de reconocimiento químico debe robusta.
- ✦ La zona sensora y el sistema de detección deben ser totalmente compatibles, lo cual no siempre es posible.

5. Ventajas e inconvenientes de los sensores de flujo

Como conclusión podemos señalar que los optosensores presentan una serie de ventajas como son:

- ✓ Una mayor sensibilidad al reducirse la dispersión de la muestra inyectada.
- ✓ Una mejora indirecta de la selectividad eliminando especies interferentes y señales parásitas a través de medidas cinéticas.
- ✓ Una sencilla regeneración de la fase sensora, de forma simple y automática, en el caso de irreversibilidad del mecanismo de reconocimiento.
- ✓ Una mejora de las características intrínsecas de los sensores derivadas del empleo de la técnica FIA como son: automatización, flexibilidad, acondicionamiento y desarrollo de métodos sencillos, desarrollo previo de reacciones químicas, etc.

Por el contrario, las mayores desventajas de los sensores de flujo son:

- ✗ La necesidad de un sistema para impulsar la muestra.
- ✗ La dificultad del análisis remoto a largas distancias y en micromuestras, que se reduce drásticamente en el caso de los optosensores de fibra óptica.
- ✗ La necesidad de que la zona sensible y el detector sean compatibles.
- ✗ La posibilidad de problemas si las cinéticas derivadas de los pasos de separación y reacción son demasiado lentas.

A-4. Sensores tipo sonda (Optodos)

El crecimiento de la fotónica y el abaratamiento de los componentes ópticos, han despertado un gran interés por la investigación y el desarrollo de sensores que usan fibra óptica²⁴.

Los sensores que usan fibra óptica han recibido la denominación de *optodos*⁴⁹ del griego "οπτιχος": óptico y "οδος": camino, u *optodos* de "optical electrode". Desde el punto de vista lingüístico es más correcto el término optodo, por ello es el que se usará a lo largo de esta memoria. Obviamente, en lo que se refiere a su principio de operación, son bastante diferentes de los electrodos, puesto que la señal es óptica y no eléctrica.

Un optodo es un dispositivo formado básicamente por una fase sensora o membrana óptimamente activa soportada sobre una guía de onda. La guía de onda más comúnmente usada para dispositivos sensores es aquella de morfología cilíndrica, es decir, la fibra óptica (ver Anexo 1). De ahí que al hablar de optodos se haga referencia en la mayoría de los casos a los sensores de fibra óptica⁵⁰⁻⁵³.

Sin embargo, existen optodos que usan guías de onda planas, dando lugar a los también llamados sensores planos o sensores tipo chip⁵⁴⁻⁵⁷.

⁴⁹ Boisdé G., *Les capteurs chimiques a fibres optiques. Realités et perspectives*, Entropía 28, 155 (1990).

⁵⁰ Wolfbeis O.S., *Fiber optic chemical sensors and biosensors*, Anal. Chem. 72, 81 (2000).

⁵¹ Wolfbeis O.S., *Fiber optic chemical sensors and biosensors*, Anal. Chem. 74, 2663 (2002).

⁵² Wolfbeis O.S., *Fiber optic chemical sensors and biosensors*, Anal. Chem. 76, 3269 (2004).

⁵³ Matías I.R., Arregui F.J., Claus R.O., *Optical fiber sensors* en Grimes C.A., Dickey E.C., Pishko M.V. (Eds.). *Enciclopedia of Sensors*. American Scientific Publishers: Stevenson Ranch, CA, USA. Vol 9, pp. 1-19 (2006).

⁵⁴ Spichiger U.E., Citterio D., Bott M., *Analyte-selective optode membranes and optical evaluation techniques: characterization of response behaviour by ATR measurements*, Proc. SPIE 2508, 179 (1995).

⁵⁵ Toth K., Nagy G., Bui T.T.L., Jeney J., Choquette S.J., *Planar waveguide ion-selective sensors*, Anal. Chim. Acta 353, 1 (1997).

⁵⁶ Lavers C.R., Itoh K., Wu S.C., Murabayashi M., Mauchline I., Stewart G., Stout T., *Planar optical waveguides for sensing applications*, Sensors & Actuators B 69, 85 (2000).

⁵⁷ Zeller P.N., Voirin G., Kunz R.E., *Single-pad scheme for integrated optical fluorescence sensing*, Biosensors & Bioelectronics 15, 591 (2000).

1. Ventajas e inconvenientes de los optodos

Las ventajas principales que presentan los optodos frente a otro tipo de sensores son las siguientes⁵⁸⁻⁶¹:

- ✓ A diferencia de los sensores potenciométricos, donde se miden diferencias absolutas entre dos potenciales, los optodos no precisan una señal de referencia.
- ✓ Son dispositivos pasivos formados por materiales dieléctricos, inertes químicamente en su mayoría, lo cual les confiere pasividad eléctrica y química. Se pueden emplear por tanto en ambientes hostiles, corrosivos, radiactivos, con riesgo de explosión, etc.
- ✓ Al ser la fibra óptica⁶² un medio dieléctrico, los optodos no se ven afectados por interferencias electromagnéticas, pudiendo utilizarse en medios altamente contaminados desde el punto de vista electromagnético, al contrario que los sensores eléctricos convencionales, muy sensibles a las mismas. En aplicaciones clínicas no representan un riesgo para el paciente ya que no se requiere una conexión eléctrica con el cuerpo, siendo especialmente útiles en radioterapia debido a su inmunidad a los campos electromagnéticos.
- ✓ La biocompatibilidad de la fibra óptica, la facilidad de realizar interfaces sencillas entre el sensor y la zona de medida facilita su empleo para la detección, medida y, a veces, actuación de/sobre variables biomédicas.
- ✓ Las pequeñas dimensiones de las fibras ópticas (con diámetros típicos comprendidos entre 50 y 200 μm) y la disponibilidad de

⁵⁸ Hotate K., *Fiber sensor technology today*, Japanese Journal of Applied Physics 45, 6616 (2006).

⁵⁹ Lee B., *Review of the present status of optical fiber sensors*, Optical Fiber Technology 9, 57 (2003).

⁶⁰ Mañas I.R., *Contribución al desarrollo de redes de sensores por fibra óptica para estructuras inteligentes*. Tesis Doctoral, Universidad Politécnica de Madrid (1996).

⁶¹ Wolfbeis O.S. en Wolfbeis O.S. (Ed.), *Fibre optic chemical sensors and biosensors*. Vol. I, CRC Press, Boca Raton, FL. Pg. 10-13 (1991).

⁶² Se hablará de fibra óptica por ser el término más generalmente empleado, pero entiéndase que de forma general hablamos de **guías de onda** (tanto de morfología cilíndrica como plana).

componentes de pequeño tamaño y bajo coste permiten la miniaturización de estos dispositivos.

- ✓ Las fibras ópticas de bajas pérdidas permiten la transmisión de señales a largas distancias, típicamente 10-1000 m, e incluso kilómetros si se utilizan amplificadores. Esto permite realizar análisis in situ en ambientes peligrosos como áreas radiactivas, entornos muy fríos o calientes y salas limpias, entre otros. Además, su empleo permite mayor flexibilidad espacial a la hora de utilizar otros instrumentos.
- ✓ Se pueden llevar a cabo análisis en tiempo real, ya que la primera etapa del proceso analítico, el muestreo, no es necesaria.
- ✓ La capacidad de multiplexación, que permite que varios sensores compartan la misma fuente y el mismo detector, disminuyendo el coste y proporcionando la posibilidad de realizar grandes redes de sensores.
- ✓ Permiten realizar análisis no destructivos (ya que en la mayoría de los casos no se produce un consumo del analito), lo cual resulta crucial si se dispone de pequeñas cantidades de muestra.
- ✓ Se puede disponer de optodos que responden a ciertos analitos para los que se carece de electrodos.
- ✓ Las fibras ópticas son capaces de transmitir mayor densidad de información que los cables eléctricos, al poseer un ancho de banda más grande. Esto es debido a que las señales ópticas pueden diferir en cuanto a longitud de onda, fase, modulación de intensidad o polarización. Como resultado, una única fibra óptica puede, en principio, transmitir simultáneamente varias señales, permitiendo por ello el análisis de varios analitos a la vez.
- ✓ La dependencia frente a la temperatura de las fibras ópticas es mucho menor que la de los electrodos. En algunos casos es incluso irrelevante; si se emplean fibras de elevado punto de fusión, se puede aumentar el intervalo de temperaturas sin modificar prácticamente las prestaciones del sensor.

No obstante, los optodos también presentan ciertas limitaciones:

- ✘ La estabilidad limitada de los reactivos inmovilizados a largo plazo. Este problema se puede compensar, en cierta manera, realizando la detección a distintas longitudes de onda, utilizando sensores basados en tiempos de vida, o bien simplemente reemplazando la fase reactiva.
- ✘ Los tiempos de respuesta elevados en algunos casos ya que, al encontrarse indicador y analito en diferentes fases, es necesaria una etapa de transferencia de masa antes de alcanzar el equilibrio y, en consecuencia, hasta que se obtiene una respuesta constante. Este problema se minimiza si se emplean pequeñas fases reactivas. Por otra parte, en algunos casos, la transferencia de masa puede resultar en un incremento de la sensibilidad y la selectividad.
- ✘ Se precisan indicadores más selectivos y procesos de inmovilización más reproducibles que permitan aumentar la sensibilidad y estabilidad a largo plazo de las sondas.
- ✘ Las fibras ópticas disponibles en la actualidad contienen impurezas de naturaleza espectral que pueden originar una absorción, fluorescencia o dispersión Raman de fondo. El material de la fibra óptica determina el intervalo útil de longitudes de onda. Así, por ejemplo, las fibras ópticas de plástico son útiles en la región comprendida entre 420-800 nm, mientras que las fibras ópticas de cuarzo son adecuadas para transmitir radiación UV y las de vidrio para medidas en el visible.
- ✘ La relativa escasez de accesorios ópticos comerciales es otro inconveniente. Se precisan fuentes luminosas estables y de larga vida, mejores conectores, fibras ópticas, láseres baratos y, aunque en la actualidad ya existan LEDs (light emitting diodes) y LDs (laser diodes) para el visible a precios asequibles, los precios aumentan

considerablemente si nos movemos hacia el UV. No obstante, se están haciendo avances en el desarrollo de LEDs en este campo⁶³.

En el terreno de la fibra óptica, se puede decir que se está revelándose como el sistema más rentable por su relación calidad-precio.

- ✗ Las fibras ópticas han sido perfeccionadas para el uso en telecomunicaciones, es decir, se han desarrollado para transmitir a ciertas longitudes de onda (1550 y 1300 nm), en donde el nivel de transparencia es máximo: la atenuación es de 0.2 dB/km en 1550 nm y de 0.35 dB/km a 1330 nm. En los sistemas de telecomunicaciones es crítico reducir al máximo la atenuación (por absorción y/o dispersión) para aumentar la distancia de repetidores.

Por lo tanto, para transmitir en el visible o incluso en el UV, las fibras ópticas no están muy perfeccionadas, aunque ya se dispone de muchas fibras para estos propósitos.

2. Clasificación de los optodos

Existen numerosos tipos de sensores de fibra óptica, y se pueden clasificar atendiendo a la tecnología (intrínsecos o extrínsecos), según la configuración (en reflexión, en transmisión o híbridos), según el punto en el que se realiza la medida (puntuales, distribuidos) o el tipo de modulación que utilizan.

Los sensores de fibra óptica se pueden clasificar en intrínsecos y extrínsecos, dependiendo de en dónde tenga lugar el reconocimiento del analito, en la fibra o fuera de ella:^{23,24,64,65}

⁶³ McGuinness C.D., Sagoo K., McLoskey D. Birch D.J.S., *A new sub-nanosecond LED at 280 nm: application to protein fluorescence*, Measurement Science & Technology 15, L19 (2004).

⁶⁴ Marazuela Lamata M.D., *Diseño, caracterización y aplicación analítica de (bio)sensores de fibra óptica para la determinación de CO₂, O₂ y metabolitos de interés clínico*. Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid (1997).

⁶⁵ Elosúa C., Matías I.R., Barrián C., Arregui F.J., *Volatile organic compound optical fiber sensors: a review*, Sensors 6, 1440 (2006).

⊙ **Sensores extrínsecos**

Los sensores extrínsecos están formados por una fase sensora externa a la propia fibra, cuyas propiedades ópticas se modifican tras su interacción con el analito. En este caso, la fibra óptica actúa transmitiendo la radiación a/desde la fase sensora. Los parámetros significativos de la fibra en este caso son: la eficiencia de la transmisión de la luz (transmitancia) y el ángulo de aceptación.

Se pueden subdividir en tres grupos:

1. De 1ª generación, optodos pasivos o directos

En ellos, la fibra tan sólo se utiliza como guía de luz. Se han utilizado para realizar análisis espectrofotométricos a grandes distancias o, por ejemplo, para aquellas aplicaciones en las que no es posible el contacto físico con la muestra (por ejemplo, análisis de muestras a elevada presión). Su resistencia, simplicidad, estabilidad, durabilidad y que no necesitan ser calibrados pueden ser alguna de sus ventajas. Sin embargo, pueden ser poco selectivos y el número de analitos para los que pueden ser utilizados es limitado.

2. De 2ª generación

En ellos la información analítica se genera a través de una reacción indicadora, ya que el analito no tiene un método inmediato de detección sensible. Un subgrupo de estos sensores son los llamados "sensores con depósito" en los que el reactivo se sitúa en un depósito y se alimenta de forma continua para su reacción con el analito en el extremo sensible.

3. De 3ª generación

Están formados por una biomolécula acoplada a un sensor de segunda generación, por ejemplo un sensor de oxígeno o de pH. Tras la reacción con la biomolécula, el analito a cuantificar se transforma/correlaciona con la especie monitorizada por el sensor de segunda generación.

Los sensores de 2ª y 3ª generación también se denominan **optodos activos o indirectos**. Se puede destacar de ellos que son más selectivos que los pasivos y que no se ven afectados por el índice de refracción del medio. Las desventajas incluyen el posible lavado o fotodescomposición del indicador en contacto con la muestra, mayores tiempos de respuesta y la mayor complejidad de construcción.

⊙ **Sensores intrínsecos**

En ellos, la propia fibra óptica actúa como sensor al modificarse alguna de sus propiedades por el analito. Por tanto, a diferencia de los sensores extrínsecos, no se mide una propiedad óptica del analito o de una fase reactiva, sino el cambio en las propiedades ópticas de la fibra provocado por la reacción química con el analito, que tiene lugar sobre la propia fibra óptica, bien sea en su núcleo o en su superficie.

Una característica muy importante de estos sensores es que se pueden utilizar como sensores distribuidos, es decir, la medida puede realizarse en cualquier punto de la fibra óptica, determinándose tanto su magnitud como su posición en la misma.

Dentro de este grupo, los efectos que han tenido mayor aplicación han sido los siguientes:

1. **Sensores refractométricos:**

En ellos se produce la interacción de la onda evanescente, transmitida hacia el exterior del núcleo de la fibra, con el medio a analizar (generalmente un líquido), modificándose las constantes de propagación de la fibra en función del índice de refracción del medio exterior.

2. **Sensores de onda evanescente**

En este caso se produce la absorción de luz por parte de las moléculas localizadas en el campo evanescente de la fibra óptica

superponiéndose las características espectrales del analito con las correspondientes a la propia fibra.

3. Sensores basados en modificaciones del recubrimiento y de la interfase núcleo-revestimiento

Las propiedades ópticas del recubrimiento de la fibra varían debido a la presencia o a la concentración del analito modificándose su interacción con la onda evanescente.

4. Sensores basados en una modificación del núcleo de la fibra

En ellos el analito origina una variación de las características ópticas del propio núcleo. En comparación con las técnicas de onda evanescente, los niveles de señal son mayores, ya que se trata de la zona de mayor densidad de energía luminosa pero, el factor limitante en los mismos es que la respuesta suele ser más lenta, ya que está condicionada por la "entrada" del analito al núcleo.

En la presente Memoria se va a desarrollar un optodo intrínseco, en configuración reflexión y basado en la modificación del núcleo de la fibra óptica.

CAPÍTULO 1

**Desarrollo de optosensores convencionales
luminiscentes para la determinación del
principio activo nafazolina en colirios
comerciales y la fitohormona ácido β -
naftoxiacético en suelos**

La nafazolina (NFZ), conocida como privina, es la 2-(1-naftilmetil)imidazolina y fue el primer derivado de la imidazolina que se empleó como descongestivo nasal (Figura 1-1). Posee acción vasoconstrictora tanto sobre mucosas nasales irritadas, por ejemplo en los casos de coriza, rinitis, como a nivel ocular, utilizándose como descongestivo conjuntival. La NFZ se encuentra en distintas preparaciones farmacéuticas comerciales, concretamente en el baño ocular Oftalmol (Laboratorios Reig Jofre S.A.), y en tres colirios como son Colirio Llorens Cloram-Zinc (Llorens S.A. Laboratorios), Euboral Oftálmico (de preparación extemporánea) (Laboratorios Bama-Geve S.A.) y Colirio Alfa (Laboratorios Rivofarma S.A.).

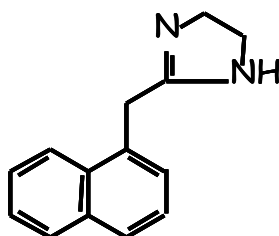


FIGURA 1-1. Estructura molecular de la NFZ

Existe un gran número de métodos analíticos para la determinación de NFZ, de los cuales la mayoría son métodos fotométricos y cromatográficos, y dentro de los métodos luminiscentes, tres son métodos fluorimétricos y tres fosforimétricos.

La mayoría de los métodos fotométricos propuestos se basan en la medida directa de absorbancia de la NFZ⁶⁶⁻⁷¹ o de complejos derivados de ésta con distintos reactivos⁷²⁻⁷⁵.

⁶⁶ Se pueden encontrar más referencias en los correspondientes trabajos.

⁶⁷ Lu X., *Determination of chlorpheniramine maleate and naphazoline hydrochloride in nasal spray*, Yaoxue Tongbao 22, 547 (1987).

⁶⁸ Zhang H., *Determination of naphazoline hydrochloride in nasal drops by dual-wavelength spectrophotometry*, Yaowu Fenxi Zazhi 11, 43 (1991).

⁶⁹ Othman S.O., *Direct determination of antazoline and naphazoline in mixtures*, Drug Dev. Ind. Pharm. 13, 1257 (1987).

En bibliografía están descritos varios métodos para la determinación de NFZ empleando cromatografía en capa fina, cromatografía de gases o cromatografía líquida de alta resolución, con detección fotométrica en la mayoría de los casos, tanto mediante medida directa de la absorbancia de la NFZ como de derivados de ésta al reaccionar con distintos reactivos.

Otra técnica separativa como es la electroforesis capilar es también una herramienta útil para análisis de NFZ^{76,77}, separándola de otras sustancias como la difenhidramina, fenilefrina o prednisolón, en gotas nasales y oculares.

También se encuentra en bibliografía una determinación de NFZ por espectrometría de absorción y emisión atómicas, basándose en la formación de asociados iónicos con cobaltonitrito sódico y ferricianida potásica.

En cuanto a métodos luminiscentes moleculares se han descrito seis, tres fluorimétricos y tres fosforimétricos. Bai⁷⁸ mide directamente la señal fluorescente de la NFZ a 327 nm, excitando a 280 nm, siendo el intervalo dinámico lineal de 0.1 a 0.5 mg/mL. Manzoori y Amjadi⁷⁹ hacen uso de la fluorimetría para determinar la NFZ en preparados farmacéuticos

70 Shoukallah I., *Determination of phenylephrine hydrochloride and carbinoxamine maleate in capsules and diphenhydramine hydrochloride and naphazoline hydrochloride in nasal jelly by 1st-order derivative UV spectroscopy*, Acta Pharm. Jugosl. 41, 107 (1991).

71 Joseph-Charles J., Bertucat M., *Simultaneous determination of naphazoline nitrate and tetramethylthionine base in eye drops by first-derivative UV spectrophotometry*, Anal. Letters 32, 373 (1999).

72 Sankar D.G., Sastry C.S.P., Reddy M.N., Aruna M., *Extraction spectrophotometric determination of some adrenergic drugs using fast green FCF or Orange II*, Indian Drugs 26, 348 (1989).

73 Szabolcs E., *Pharmaceutical applications of charge-transfer iodine complexes*, Acta Pharm. Hung. 50, 130 (1980).

74 Belal S., Elsayed M., Abdel-Hamed M., Abdine H., *Analyst* 105, 774 (1980).

75 Belal S., Elsayed M., Abdel-Hamed M., Abdine H., *Utility of chloranil in assay of naphazoline, clemizole, penicillin-g sodium, and piperazine*, J. Pharm. Sci. 70, 127 (1981).

76 Yesilada B., Tozkoparan B., Gökhan N., Öner L., Ertan M., *Development and validation of a capillary electrophoretic method for the determination of degradation product in naphazoline HCl bulk drug substance*, J. Liq. Chrom. Rel. Technol., 21, 2575 (1998).

77 Raiith K., Althoff E., Banse J., Neidhardt H., Neubert R.H., *Two examples of rapid and simple drug analysis in pharmaceutical formulations using capillary electrophoresis: naphazoline, dexamethasone and benzalkonium in nose drops and nystatin in an oily suspension*, Electrophoresis 19, 2907 (1998).

78 Referencia 35 del trabajo "Comparison of three different phosphorescent methodologies in solution for the analysis of naphazoline in pharmaceutical preparations".

79 Referencia 12 del trabajo "A fluorescence optosensor for analyzing naphazoline in pharmaceutical preparations. Comparison with other sensors".

directamente y en complejación con ciclodextrinas llegando a conseguir un límite de detección de 15 ng/mL.

Como ya se ha indicado, hasta la fecha existen tres métodos fosforimétricos para la determinación de este analito. El primero fue desarrollado por McCall y Winefordner⁸⁰, estableciendo unos máximos de excitación y emisión para la nafazolina, soportada en papel de filtro, de 290 y 485-520 nm, respectivamente. Los límites de detección alcanzados fueron de 1.5 y 15.0 ng para medidas a 90 K y a temperatura ambiente, respectivamente. Los dos métodos fosforimétricos restantes⁸¹ son en disolución y han sido desarrollados por nuestro grupo de investigación. El primero está basado en el empleo de medios organizados, concretamente dodecil sulfato sódico; en él se determina dicho analito a unos máximos de excitación y emisión de 290 y 488-524 nm respectivamente, obteniéndose un límite de detección de 64.2 ng/mL. El segundo mide la emisión directamente del analito en disolución, sin medio organizado, sólo con la presencia de átomo pesado y desoxigenante, base de la metodología HAI-RTP (heavy atom-induced room-temperature phosphorescence). En este caso se midió a 288/524 nm y usando una concentración de KI de 1 M y 0.01 M de Na₂SO₃ se consigue un límite de detección de 43.5 ng/mL.

⁸⁰ Referencia 36 del trabajo "Comparison of three different phosphorescent methodologies in solution for the analysis of naphazoline in pharmaceutical preparations".

⁸¹ Referencias 11 y 37 del trabajo "Comparison of three different phosphorescent methodologies in solution for the analysis of naphazoline in pharmaceutical preparations".

El ácido 2-naftoxiacético (β -NOA) es una fitohormona que regula el crecimiento de las plantas (Figura 1-2) al producir una maduración temprana de la fruta, promoviendo el crecimiento de las raíces, especialmente en manzanas, uvas, fresas y tomates.

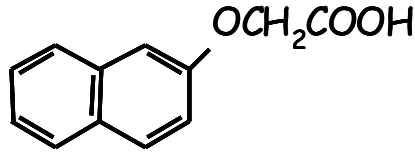


FIGURA 1-2. Estructura molecular del β -NOA

En España se utiliza en tomate y berenjena para inducir la formación de frutos sin semilla y adelantar su maduración. La dosis normal suele oscilar entre 40-60 mg de componente activo por litro ó 25 mL por litro, en formulaciones líquidas.

Dada su baja toxicidad, los niveles de tolerancia de este compuesto son relativamente altos en las legislaciones de varios países. A pesar de que no son sustancias muy tóxicas, pueden ser peligrosas si se consumen en grandes cantidades. Los niveles de tolerancia, dosis y limitaciones en el uso del β -NOA han sido publicados por la Agencia de Protección del Medio Ambiente⁸², presentando una LD_{50} ⁸³ por ingesta oral en ratas de 600 mg/kg.

Esta hormona se encuentra analizada, según la bibliografía⁸⁴, mediante HPLC, cromatografía de gases y electroforesis capilar. Los límites de detección conseguidos con estas metodologías separativas van desde los 20 a 860 ng/mL. Sin embargo, la mayor parte de métodos encontrados se

⁸² EPA Compendium of Registered Pesticides (1968).

⁸³ La toxicidad se define con el término DL_{50} que significa la dosis necesaria de dicho compuesto para matar al 50% de los animales a los cuales se les ha administrado bajo condiciones experimentales, expresado en miligramos de producto tóxico por kilogramo de peso del cuerpo del animal. La DL_{50} se mide en términos de oral (mediante alimentación o colocación directa en el estómago del animal, ratas principalmente), dérmica (aplicada a la piel de conejos) y respiratoria (por inhalación).

⁸⁴ Ver referencias en el trabajo "The development and comparison of a fluorimetric and a phosphorescence optosensors for determining the plant growth regulator 2-naphthoxyacetic acid".

basan en la luminiscencia molecular; unos pocos hacen uso de medidas fluorescentes y la mayoría son fosforimétricos (desde el convencional fosforimétrico a baja temperatura, que dio paso al fosforescente a temperatura ambiente inicialmente en soportes sólidos y finalmente medida en medios con micelas, microemulsiones y átomos pesados). Los límites de detección que se obtienen con estos métodos luminiscentes van desde los 1.2 ng/mL del método espectrofluorimétrico directo a los 243 ng/mL del método fosforimétrico a temperatura ambiente usando microemulsiones.

Según la búsqueda bibliográfica realizada sobre los métodos existentes para determinar NFZ y β -NOA, podemos en general afirmar que los métodos fotométricos presentan baja selectividad y sensibilidad y los separativos son caros y requieren más tiempo para realizarlos. Por estas razones, el desarrollo de optosensores luminiscentes para el análisis de productos farmacéuticos y de importancia ambiental es un área muy prometedora, puesto que éstos unen las ventajas de la espectroscopía en fase sólida con aquellas ventajas intrínsecas propias del análisis en flujo: mayor sensibilidad y selectividad debido a la preconcentración de la muestra en una pequeña área del soporte sólido, mayores velocidades de análisis, posibilidad de automatización, menor consumo de reactivos, etc., dando lugar a metodologías simples y baratas, con óptimas características analíticas, comparadas con las de los procedimientos espectroscópicos convencionales.

En el presente capítulo se han desarrollado cuatro optosensores luminiscentes, dos para determinar NFZ en colirios comerciales (uno fluorescente y otro fosforescente) y otros dos para la determinación de β -NOA en muestras de suelos (uno fluorescente y otro fosforescente), comparándose sus características y prestaciones.

De los cuatro optosensores convencionales desarrollados se han derivado tres trabajos:

- ➔ El primero de ellos se titula: ***Comparison of three different phosphorescent methodologies in solution for the analysis of naphazoline in pharmaceutical preparations***, publicado en *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 379, 30-34 (2004).

En este trabajo se muestran las características de un optosensor convencional fosforescente para la determinación de NFZ en dos colirios comerciales (Euboral Oftálmico y Colirio Alfa) a la vez que se hace una minuciosa comparación de condiciones experimentales y características

analíticas entre dicho optosensor y otros dos métodos fosforimétricos en disolución a temperatura ambiente para la NFZ desarrollados en nuestro grupo de investigación: uno haciendo uso de micelas para estabilizar la señal fosforescente (MS-RTP: micelle stabilized-room temperature phosphorescence) y otro usando un desoxigenante y un átomo pesado (HAI-RTP: heavy atom induced-room temperature phosphorescence).

Nuestro grupo de investigación tiene una amplia experiencia en metodologías fosforescentes en disolución a temperatura ambiente, por lo que resulta muy atractivo hacer este estudio comparando varias de estas metodologías. De este estudio se sacan conclusiones respecto al tiempo de análisis, simplicidad, sensibilidad y selectividad de los tres métodos.

Como en el trabajo en sí no hubo cabida para la explicación del desarrollo del optosensor, se profundizará un poco más en él en la parte final de este capítulo, para que quede claramente expuesta la metodología llevada a cabo en la implementación de este sistema sensor fosforescente.

- ➔ El segundo trabajo derivado del trabajo experimental desarrollado en este capítulo se titula: ***A fluorescence optosensor for analyzing naphazoline in pharmaceutical preparations. Comparison with other sensors.*** Está publicado en *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 38, 785-789 (2005).

En este trabajo se hace un concienzudo análisis de cada uno de los parámetros instrumentales y variables experimentales que afectan al desarrollo de un optosensor fluorescente para la determinación de NFZ en colirios comerciales.

Se comparan además las prestaciones obtenidas con este optosensor con el resto de métodos existentes en bibliografía (cromatográficos, fotométricos, etc.), y especialmente con el optosensor fosforescente desarrollado en el anterior trabajo.

- ➔ Y por último, el tercer trabajo derivado de este capítulo es: ***The development and comparison of a fluorescence and a phosphorescence optosensors for determining the plant growth regulator 2-***

naphthoxyacetic acid. Se ha publicado en *Sensors and Actuators B*, 107, 929-935 (2005).

El desarrollo de ambos optosensores luminiscentes, los primeros sensores existentes en bibliografía para la determinación de β -NOA, y la comparación de ambos en cuanto a tiempo y coste por análisis, portabilidad, potencial de miniaturización, coste y características analíticas son los objetivos de este trabajo.

Beatriz Cañabate Díaz · Silvia Casado Terrones
Antonio Segura Carretero · José Manuel Costa Fernández
Alberto Fernández Gutiérrez

Comparison of three different phosphorescent methodologies in solution for the analysis of naphazoline in pharmaceutical preparations

Received: 2 October 2003 / Revised: 20 January 2004 / Accepted: 29 January 2004 / Published online: 25 February 2004
© Springer-Verlag 2004

Abstract We present results from a comparative study of three proposed phosphorimetric methods for determination of naphazoline (NPZ) in solution. The first method is based on use of micelles to stabilize phosphorescence signals in solutions at room temperature (MS-RTP). The second is based on the use of a heavy atom salt and sodium sulfite as an oxygen scavenger to obtain room-temperature phosphorescence (HAI-RTP) in solution. The last method employs an optical sensor for NPZ based on the phosphorescent properties of the analyte on a solid sensor phase. The aim of this work was to compare time consumption, simplicity, sensitivity, selectivity, detection, and quantification limits for use of these three phosphorimetric methods to determine naphazoline in pharmaceutical preparations. The most simple, sensitive, and reproducible of the three methods for naphazoline analysis is the HAI-RTP method. Detection limits are 4.9, 1.7, and 9.4 ng mL⁻¹, respectively, for the MS-RTP, HAI-RTP, and optosensor methods.

Keywords Phosphorimetry · Pharmaceutical analysis · Naphazoline

Introduction

The observation of phosphorescence in the past was limited to rigid systems, especially those at liquid nitrogen temperatures (LTP) [1] or to analytes adsorbed on solid substrates (SS-RTP) [2]. A common aspect of phospho-

rimetry in fluid solution is the need for some form of molecular immobilization, protection, or both, to minimize non-radiative decay of luminophores, collisions with solvent, or the possibility of photochemical reaction.

Kalyanasundaram et al. [3] reported that room-temperature phosphorescence (RTP) in fluid solutions could be observed in the presence of micelles, heavy atoms, and nitrogen to effect deoxygenation. On the basis of that report, Cline Love [4] established micelle-stabilized room temperature phosphorescence (MS-RTP) as an analytical method. Following the successful application of MS-RTP, cyclodextrin-induced RTP (CD-RTP) [5], vesicle-stabilized RTP (VS-RTP) [6], and microemulsion-stabilized RTP (ME-RTP) [7], were developed. As can be seen from the evolution of RTP, there is a need to provide a protective, ordered medium to minimize self-quenching and to organize reactants on a molecular level, and to increase the proximity of heavy atoms and analytes [8, 9].

Later studies [10] have demonstrated that RTP emission of some compounds can be directly induced in aqueous solutions assisted only by addition of relatively high concentrations of a heavy atom perturber and sodium sulfite as chemical deoxygenator [11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19]. This type of RTP emission has been called heavy atom induced -room temperature phosphorescence (HAI-RTP) [10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21].

During the last ten years the advantages of using optical sensors for such analyses have been demonstrated [22]. The combination of flow-injection techniques with detection on optically active surfaces comprising an immobilised indicator packed in a flow-through cell has been called an “optosensor” [23] and has proved to have important advantages because of its high sensitivity and selectivity, precision, simplicity, speed, and low cost [24]. Further developments of these optosensing techniques have shortened analysis time considerably and reduced the cost of environmental monitoring.

Many non-prescription topical decongestants for ophthalmic or nasal use contain 2-imidazolidine-derived drugs. Naphazoline, 2-(1-naphthylmethyl)-2-imidazoline, is a potent *alpha*-adrenergic agonist, with vasoconstrictive and

B. C. Díaz · S. C. Terrones · A. S. Carretero (✉) · A. F. Gutiérrez
Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences,
University of Granada, Campus Fuentenueva s/n,
18071 Granada, Spain
e-mail: ansegura@ugr.es

J. M. C. Fernández
Department of Physical and Analytical Chemistry,
Faculty of Chemistry, University of Oviedo,
C/ Julian Clavería 8, 33006 Oviedo, Spain

decongestive properties. Several analytical methods are used to determine naphazoline (NPZ); most are photometric [25] and chromatographic methods. Different types of chromatographic method have been reported in the literature, including thin-layer chromatography [26, 27], gas chromatography [28], and high-performance liquid chromatography [29, 30, 31, 32, 33, 34]. The literature also contains a report of the use of a fluorimetric method [35] to determine naphazoline in ophthalmic solution at $\lambda_{\text{ex/em}}=280/327$ nm, with a linear range between 0.1 and 0.5 mg mL⁻¹. NPZ has native phosphorescence and four phosphorimetric methods have been described. Among these, one was developed on filter paper ($\lambda_{\text{ex/em}}=290/485, 520$ nm) [36] and the others were proposed by our research group [11, 37].

In this work we compare different experimental conditions and analytical characteristics of three phosphorimetric methods. The first is based on the micelle-stabilized media, another on HAI-RTP methodology, and the last is a flow-through optosensor. All these methods were proposed for analysis of naphazoline in pharmaceutical preparations.

Material and methods

Reagents

The surfactant sodium dodecyl sulfate (SDS), analytical reagent grade thallium(I) nitrate, potassium iodide, sodium chloride, sulfuric acid, acetone, and anhydrous sodium sulfite (all from Sigma) were used as received. Aqueous solutions were made with doubly distilled water. The sodium sulfite solutions were prepared daily and kept in tightly stoppered containers. The non-ionic resin Amberlite XAD 7 (Sigma) was sieved and the 80–120 μm grain size was used. Naphazoline (Sigma) was used without further purification. Working solutions were prepared by suitable dilution of the stock solution (30 mg L⁻¹) with deionized water.

Instrumentation and flow set-up

A Varian Cary-Eclipse fluorescence spectrophotometer (Varian Iberica, Madrid, Spain) was used to obtain the phosphorescence spectra and the relative phosphorescence intensity measurements. The spectroluminometer is equipped with a xenon discharge lamp (75 kW), Czerny-Turner monochromators, R-928 photomultiplier tube which is red sensitive (900 nm) with manual or automatic voltage control, using the Cary Eclipse software for Windows 95/98/NT. The photomultiplier detector voltage was 850 V and the instrument excitation and emission slits were both set at 20 nm. The delay time used was 0.12 ms and the gate time was 5 ms.

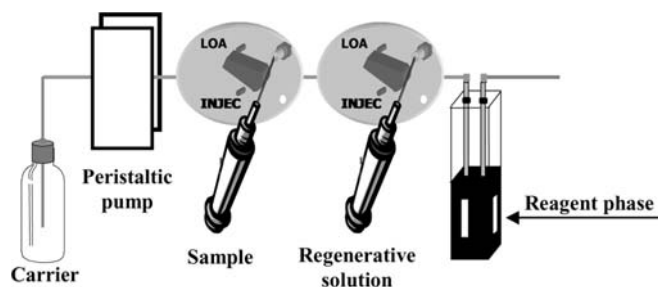


Fig. 1 The flow manifold employed

Figure 1 illustrates the optosensing FIA manifold used. A Hellma Model 176.052-QS flow-through cell of 25 μL volume was packed with the corresponding resin and placed in the conventional sample compartment of the detector. Two rotary valves (Supelco 5020) were used for sample introduction and for elution of the retained NPZ. PTFE tubing (1.1 mm i.d.) and fittings were used for connecting the flow-through cell, the rotary valves, and the carrier solution reservoirs. A Gilson Miniplus-3 peristaltic pump was used to generate the flow stream.

pH was measured with a MicropH 2002 meter (Crison, Barcelona, Spain).

General procedure

MS-RTP method

An aliquot of the NPZ stock standard solution, 0.45 mL 0.5 mol L⁻¹ SDS, 0.84 mL 0.25 mol L⁻¹ thallium nitrate, 0.64 mL 0.1 mol L⁻¹ sodium sulfite, and 0.67 mL 0.02 mol L⁻¹ sulfuric acid were introduced into a 10-mL calibrated flask and diluted to volume with water. The inclusion of the heavy atom salt in the solution can cause slight precipitation, which disappears on warming the flask in a water-bath, before the other reagents are added. After thorough mixing the flask was placed in a water bath at 25.0 \pm 0.1 $^{\circ}\text{C}$ for 1 min. At 25 $^{\circ}\text{C}$ the critical micellar concentration for SDS is 8.1 mmol L⁻¹, so the formation of micelles is spontaneous at the SDS concentration chosen. Standard 10-mm fused-silica cells were filled with this solution. Relative phosphorescence intensities (RPI) were measured at 524 nm with excitation at 290 nm. Reagents blanks lacking NPZ were prepared and measured by following the same procedure.

HAI-RTP method

An aliquot of the NPZ stock solution, 5 mL 2 mol L⁻¹ potassium iodide and 1 mL 0.1 mol L⁻¹ sodium sulfite were introduced into a 10 mL calibrated flask and diluted to volume with water. Standard 10-mm fused-silica cells are filled with this analyte solution. Reagents blanks lacking naphazoline were prepared and measured following the same procedure. The intensities of the samples and the corresponding blanks were measured at the phosphorescence wavelength maxima $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$ 288/524 nm.

Flow-through optosensor

Naphazoline sample (2 mL, with 1.6 mol L⁻¹ KI and 15 mmol L⁻¹ Na₂SO₄) were injected via the first valve into a channel of 1.6 mol L⁻¹ KI and 15 mmol L⁻¹ Na₂SO₃ carrier. At 2 mL min⁻¹ flow-rate the naphazoline is retained in the flow cell on Amberlite XAD7 and the phosphorescence was measured at $\lambda_{\text{ex/em}}=290/520$ nm. Regenerative solution (1 mL 2 mol L⁻¹ NaCl with 15% acetone) was injected through second valve to elute the analyte retained on the sensing zone, before proceeding with the next sample injection.

Procedure for pharmaceutical preparations

Two different commercial products were analysed using these three methods – Euboral Oftálmico (Bama-Geve SA) with a nominal content of 10 mg g⁻¹ naphazoline and also containing sodium tetraborate, 970 mg g⁻¹, and methyl *p*-hydroxybenzoate 20 mg g⁻¹, and Colirio Alfa (Rivofarma SA) with a nominal content of 3 mg mL⁻¹ and also containing copper sulfate, trisodium citrate, potassium chrome alum, boric acid, camphor, methyl *p*-hydroxybenzoate, propyl *p*-hydroxybenzoate, sodium hydroxide, and sodium chloride, without indication of their concentration.

Portions of two products were dissolved in doubly distilled water. Aliquots of these solutions were treated as indicated under General procedure for each method.

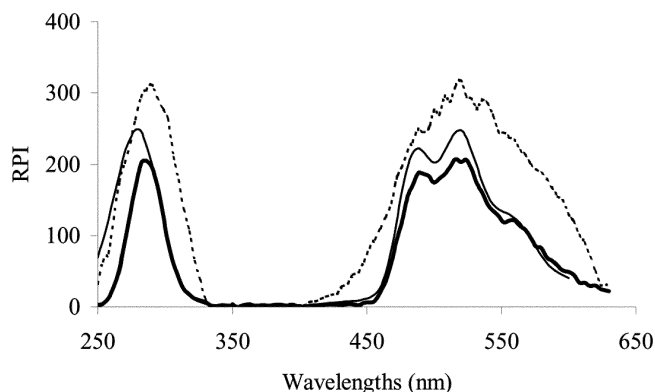


Fig. 2 Phosphorescence spectra obtained from 400 ng mL⁻¹ NPZ: MS-RTP (*thin continuous line*), HAI-RTP (*thick continuous line*), and optosensor (*broken line*)

Results and discussion

Phosphorescence spectral characteristics

The different instrumental conditions which could affect the phosphorescence response, such as wavelength maxima, decay time, gate time, and detector sensitivity were conveniently selected.

The phosphorescence wavelengths for the MS-RTP method are 290 and 524 nm for excitation and emission, respectively. In HAI-RTP phosphorescence wavelengths of 288 nm and 524 nm were obtained as optimal values. On the Amberlite XAD7 (optosensor) naphazoline emits phosphorescence with a maximum excitation intensity at 290 nm and maximum emission intensity at 520 nm. These wavelengths are very similar those in solution. The phosphorescence spectra obtained for NPZ by use of the three different methods are showed in Fig. 2.

As is apparent from the figure, the shape of MS-RTP and HAI-RTP spectra were very similar but for the optosensor spectrum the influence of the solid support changes the shape of the emission spectrum.

Table 1 Instrumental conditions for the three methods

Method	$\lambda_{\text{ex/em}}$ (nm)	t_d (ms)	t_g (ms)	Detector voltage (V)	Slits _{ex/em} (nm)
MS-RTP	290/524	0.12	5	600	20/20
HAI-RTP	288/524	0.12	5	1000	20/20
Optosensor	290/520	0.12	5	850	20/20

Table 2 Reagents and optimum concentrations for each method

Method	Solid support	Organized medium [SDS] (mmol L ⁻¹)	Heavy atom		Deoxygenator [Na ₂ SO ₃] (mmol L ⁻¹)	Acid medium [H ₂ SO ₄] (mmol L ⁻¹)
			[KI] (mol L ⁻¹)	[TiNO ₃] (mmol L ⁻¹)		
MS-RTP	–	22.0	–	21.0	6.4	1.3
HAI-RTP	–	–	1.0	–	10.0	–
Optosensor	Amb. XAD7	–	1.6	–	15.0	–

The delay time used was typically 0.12 ms and the gate time was 5 ms. The photomultiplier detector voltage was 600 V for MS-RTP, 1000 V for HAI-RTP, and 850 V for the optosensor. Detector voltage is the uniquely different instrumental condition for the three methods. The instrument excitation and emission slits were both set at 20 nm. All these instrumental variables were kept constant for the rest of the experimental work (Table 1).

Experimental variables

Table 2 shows the optimum experimental variables necessary to develop the three different methods proposed for NPZ. The careful selection of these experimental conditions has been described elsewhere [11, 37].

It is apparent from this table that in the three methods it is necessary to use a heavy atom (KI or TiNO₃) and deoxygenator to develop the phosphorescence of the analyte.

On other hand, only for MS-RTP and the optosensor, respectively, are an organized medium (SDS) or a solid support (Amberlite XAD7) necessary to obtain a phosphorescence signal for naphazoline.

It is also necessary to indicate the use of an acid medium (H₂SO₄) in MS-RTP to minimise the stabilization time or time necessary for deoxygenation of the samples. Deoxygenation was necessary for use of the optosensor because the solid support is in contact with the solution.

The most simple method is HAI-RTP because it uses only a heavy atom and a deoxygenator as experimental variables.

Analytical characteristics

Analytical performance characteristics of the three methods under these experimental conditions were evaluated. Standard calibration graphs, prepared according to recommended procedure, were linear, passing through the origin for all the methods studied. All the features of the methods are summarized in Table 3.

The wide linear ranges and standard errors and correlation coefficients indicate very good calibration linearity. The detection and quantification limits and sensitivity [38] were calculated. The precision, expressed as relative standard deviation, was determined by measuring RTP intensities of ten replicates, containing 400 ng mL⁻¹ naphazoline, for each method.

Table 3 Analytical properties of the proposed methods

Property	MS-RTP	HAI-RTP	Opto-sensor
Slope	18.30	13.20	0.34
Intercept	0.53	0.69	3.07
Correlation coefficient	0.998	0.999	0.994
Sensitivity (ng mL ⁻¹)	16.66	8.22	11.6
Detection limit (ng mL ⁻¹)	4.9	1.7	9.4
Quantification limit (ng mL ⁻¹)	16.3	5.6	31.2
Linear range (ng mL ⁻¹)	16.3–1000	5.6–1000	31.2–1000
RSD (%) (at 400 ng mL ⁻¹ level)	2.05	1.05	2.32

Table 4 Study of recoveries from samples of both pharmaceuticals

Method	Colirio Alfa		Euboral Oftálmico	
	Recovery (%)	RSD (%) ^a	Recovery (%)	RSD (%) ^a
MS-RTP	97.9	1.60	96.2	2.20
HAI-RTP	93.2	2.02	90.0	4.75
Optosensor	104.9	9.38	101.4	8.92

^aFor seven replicates

Table 5 Comparison of analytical performance of the three RTP methods under scrutiny

	MS-RTP	HAI-RTP	Optosensor
Simplicity	Average	Excellent	Good
Sensitivity	Bad	Good	Average
Time consumption	Bad	Average	Good
Reproducibility	Average	Good	Bad

Applications

The three phosphorimetric methods were satisfactorily applied to the determination of naphazoline in two eye drops, Colirio Alfa and Euboral Oftálmico.

Results obtained from recovery experiments are shown in Table 4.

For both products tested, statistical analysis of the assay results showed the precision of the three proposed phosphorimetric methods was satisfactory with no significant differences between indicated and experimental results except for the optosensor method, for which repeatability was worst.

The shape of spectra from naphazoline standard and from pharmaceutical samples were very similar and no interferences were observed.

Conclusions

These phosphorimetric techniques provide good sensitivity and selectivity for determination of small amounts of chemicals in real samples.

These methods can be recommended for the routine determination of naphazoline because of their sensitivity, precision, speed, and simplicity, which are superior to those of liquid chromatographic methods described previously.

A summary of conclusions reached from comparison of the three phosphorimetric methods studied is given in Table 5.

Acknowledgements The authors gratefully acknowledge the financial support of Secretaría de Estado de Educación y Universidades (Spain) and Ministerio de Ciencia y Tecnología (Proyecto PPQ 2000-1291-C02-01 and Proyecto MAT2003-09074-C02-01)

References

- Wellons SL, Paynter RA, Winefordner JD (1974) *Spectrochim Acta A* 30:2133
- Vo-Dinh T (1984) Room temperature phosphorimetry for chemical analysis. Wiley, New York
- Kalyanasundaram K, Grieser F, Thomas JK (1977) *Chem Phys Lett* 51:501
- Cline Love LJ, Skrilec M, Habarta JG (1980) *Anal Chem* 52:754
- Turro NJ, Bolt JD, Luroda Y, Tabushi I (1982) *Photochem Photobiol* 35:69
- Fernández de la Campa MR, Ming Liu Y, Díaz García ME, Sanz-Medel A (1990) *Anal Chim Acta* 238:297
- Ramis Ramos G, Khasawneh IM, García-Álvarez-Coque MC, Winefordner JD (1988) *Talanta* 35:41
- Hurtubise RJ (1993) *Anal Chem* 55:669A
- Kim H, Crouch SR, Zabik MJ, Selim SA (1990) *Anal Chem* 62:2365
- Segura Carretero A, Cruces Blanco C, Cañabate Díaz B, Fernández Gutiérrez A (1998) *Anal Chim Acta* 361:217
- Fernández Gutiérrez A, Segura Carretero A, Cañabate Díaz B, Cruces Blanco C (1999) *Appl Spectrosc* 53:741
- Segura Carretero A, Cruces Blanco C, Ramírez García I, Cañabate Díaz B, Fernández Gutiérrez A (1999) *Talanta* 50:401
- Cruces Blanco C, Segura Carretero A, Fernández Sánchez JF, Fernández Gutiérrez A (2000) *J Pharm Biomed Anal* 23:845
- Segura Carretero A, Cruces Blanco C, Fernández Gutiérrez A (1998) *J Agric Food Chem* 46:3683
- Cruces Blanco C, Segura Carretero A, Ramírez García I, Fernández Gutiérrez A (1999) *Int J Environ Anal Chem* 75:377
- Segura Carretero A, Cruces Blanco C, Cañabate Díaz B, Fernández Sánchez JF, Fernández Gutiérrez A (2000) *Anal Chim Acta* 417:19–30
- Segura Carretero A, Cruces Blanco C, Fernández Sánchez JF, Cañabate Díaz B, Fernández Gutiérrez A (2000) *J Agric Food Chem* 48:4453
- Li L, Chen Y, Zhao Y, Tong A (1997) *Anal Chim Acta* 341:241
- Li L, Zhao Y, Wu Y, Tong A (1998) *Talanta* 46:1147
- Li L, Chen Y, Tong A (1996) *Huaxue Tongbao* 6:46
- Cañabate Díaz B, Schulman SG, Segura Carretero A, Fernández Gutiérrez A (2003) *Anal Chim Acta* 489:165
- Valcárcel M, Luque de Castro MD (1990) *Analyst* 1156:699
- Valcárcel M, Luque de Castro MD (1994) *Flow-through (bio)chemical sensors*. Elsevier, The Netherlands
- Costa Fernández JM, Sanz Medel A (2001) *Fosforescencia Molecular Analítica: Una Aproximación Práctica*, eds Fernández Gutiérrez A and Schulman SG, Editorial Universidad de Granada, Granada, Ch X
- Slack SC, Mader WJ (1957) *J Am Pharm Ass Sci Edn* 46:742
- Puech A, Kister G, Chanal J (1968) *J Pharm Belg* 23:184
- Goenechea S (1968) *J Chromatogr* 36:375
- Massaccesi M (1987) *Pharm Acta Helv* 62:302
- Bauer J, Krogh S (1983) *J Pharm Sci* 72:1347
- Kountourellis JE, Raptouli A (1988) *Anal Lett* 21:1361

31. Bocic R, Vallejos C, Álvarez-Luege A, López F (1992) *J AOAC Int* 75:902
32. Chabenat C, Boucly P (1992) *Biomed Chromatogr* 6:241
33. Deorsi D, Gagliardi L, Cavazzutti G, Mediati MG, Tonelli D (1995) *J Liq Chromatogr* 18:3233
34. Ruckmick SC, Marsh DF, Duong DT (1995) *J Pharm Sci* 84:502
35. Bai L (1988) *Yaoxue Tongbao* 23:739
36. McCall SL, Winefordner JD (1983) *Anal Chem* 55:391
37. Segura Carretero A, Cruces Blanco C, Cañabate Díaz B, Fernández Gutiérrez A (1998) *Analyst* 123:1069
38. Cuadros Rodríguez L, García Campaña AM, Jiménez Linares C, Román Ceba M (1993) *Anal Lett* 26:1243

Short communication

A fluorescence optosensor for analyzing naphazoline in pharmaceutical preparations Comparison with other sensors

S. Casado-Terrones^a, J.F. Fernández-Sánchez^{a,b}, B. Cañabate Díaz^a,
A. Segura Carretero^{a,*}, A. Fernández-Gutiérrez^{a,*}

^a Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Granada, C/Fuentenueva s/n, 18071 Granada, Spain

^b Center for Chemical Sensors, Swiss Federal Institute of Technology Zurich (ETHZ), Technoparkstrasse 1, CH-8005 Zürich, Switzerland

Received 18 September 2004; received in revised form 11 February 2005; accepted 12 February 2005

Available online 23 March 2005

Abstract

We have developed an optical sensor for determining and quantifying naphazoline (NPZ) based on its inherent fluorescence property. We have placed a non-ionic-exchanger solid support (Amberlite XAD-7) in a flow cell in the light path of the excitation beam and the fluorescence signal for NPZ is continuously monitored at $\lambda_{\text{exc/nm}} = 294/306$ nm. The response time for this sensor is acceptably fast, 80 s, obtaining a detection limit of 2.6 ng mL^{-1} with standard deviations of 2.0% at 125 ng mL^{-1} . This device has been satisfactorily applied to two commercial formulations and its selectivity has been demonstrated with an interference study. The advantages have been compared with the only published sensor for determining NPZ in pharmaceutical preparations and with other analytical methods in the literature.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Naphazoline; Fluorescence optosensor; Comparative study

1. Introduction

Naphazoline, 2-(1-naphthylmethyl)-2-imidazoline (NPZ), is a relatively long-lasting action vasoconstrictor, which acts on the alpha receptors of the smooth vascular muscle [1]. There are several analytical methods to determine NPZ; the majority are photometric [2,3] and chromatographic methods: thin layer chromatography [4], gas chromatography [5] and high performance liquid chromatography [6,7]. Capillary electrophoresis [8–10] and atomic absorption and emission [11] methods have also been published. NPZ presents intrinsic fluorescence and phosphorescence emission, thus different luminescence methods have been developed for its determination [12–15]. All of them present too many complications for routine lab use. The photometric methods are

not selective and sensitive enough, the separative methods are expensive and require too much time and the luminescence methods are manual and require the work of an analyst. For these reasons, the research efforts devoted to flow-through optosensors in pharmaceutical analysis are very promising because they link the advantages of solid phase spectroscopy (SPS) with the intrinsic ones from flow injection analysis (FIA) i.e. higher sensitivity and selectivity, higher speed analysis, less consumption of reagents and all the main FIA characteristics. Flow-through optosensors produce very simple and inexpensive analytical procedures with remarkable analytical features, mainly sensitivity and selectivity, compared to the respective conventional spectroscopic procedures [16].

In the literature, it is possible to find many applications of fluorescence optosensing for analysing drugs [17–19]. Our research group has published in 2004, the first optosensor based on the native phosphorescence of a compound for determining NPZ in pharmaceutical preparations [20], obtaining a detection limit of 9.4 ng mL^{-1} with 2.3% of relative

* Corresponding authors. Tel.: +34 958243296/7; fax: +34 958249510.

E-mail addresses: asegura@ugr.es (A.S. Carretero),
albertof@ugr.es (A. Fernández-Gutiérrez).

standard deviation at 400 ng mL^{-1} concentration level. In this work, we present a simpler, cheaper, more sensitive and easier to manufacture sensor for determining NPZ in pharmaceutical preparations. To demonstrate its advantages we have compared our fluorescence optosensor with the sensor for determining NPZ and with other methods, showing the best characteristics to use in a control or a routine laboratory.

2. Experimental

2.1. Reagents

Naphazoline (Sigma Spain) was used without further purification. Working solutions were daily prepared by suitable dilution of the stock solution (30 mg L^{-1}). The strongly basic anion-exchanger resins Dowex 1x2-100, 1x4-100 and 1x8-100, Denom Sephadex-QAE A-25 and Deae Sephadex A-25, the strongly acid cation-exchanger resins Dowex 50wx2-100, 50wx4-100 and 50wx8-100, Sephadex-SP C-25 and Denom Sephadex-CM C-25 and the non-ionic resins Amberlite XAD 2, XAD 4 and XAD 7 and Silica Gel Davisil and Merck (Sigma Spain) were sieved and then tested at five-grain size (40–63, 63–80, 80–120, 120–160 and $>160 \mu\text{m}$), except all Sephadex resins which were sieved until a minimum size of $120 \mu\text{m}$.

2.2. Flow set-up and instrumentation

The same optosensing FIA manifold which was proposed by Fernández-Sánchez et al. [16] is used. A Hellma Model 176.052-QS flow-through cell of $25 \mu\text{L}$ volume was packed with the corresponding solid support and placed in the conventional sample compartment of the spectrometer (Aminco Bowman Series 2 luminescence spectrometer). Two rotary valves (Sepulco 5020) were used for sample introduction and for elution of the retained NPZ. PTFE tubing (0.8 mm i.d.) and fittings were used for connecting the flow-through cell, the rotary valves and the carrier solution reservoirs. A Gilson Minipuls-3 peristaltic pump was used to generate the flow stream.

The optosensor response was taken to be the difference between fluorescent emissions and background signals and all the measurements were repeated three times to obtain the error.

2.3. General procedure

Two milliliter of sample was injected through the first valve into a channel of 10 mM glycine/NaOH buffer solution at pH 8 into the carrier stream. In this medium, at a 2.5 mL min^{-1} flow-rate, the NPZ is retained in the flow cell on Amberlite XAD 7. After fluorescent measurement ($\lambda_{\text{exc/nm}} = 294/326 \text{ nm}$, detector voltage of 750 V , slit width of 4 nm for excitation and emission), $250 \mu\text{L}$ of regenerative

solution (acetone) was injected through the second valve to strip the analyte retained on the solid phase, before proceeding with the next sample.

2.4. Procedure for analysing pharmaceutical preparations

Two different commercial products were analysed: Colirio Alfa (Pfizer Consumer Healthcare, Barcelona, Spain) with a nominal content of $300 \mu\text{g mL}^{-1}$ of NPZ and also containing copper sulphate, trisodium citrate, potassium chrome alum, boric acid, camphor, methyl *p*-hydroxybenzoate, sodium hydroxide and sodium chloride, without indication of their concentration; and Euboral Oftálmico (Laboratorio Reig Jofré, Barcelona, Spain) with a nominal content of 10 mg g^{-1} of NPZ and also containing sodium tetraborate (970 mg g^{-1}) and methyl *p*-hydroxybenzoate (20 mg g^{-1}).

A portion of the two products was dissolved in doubly distilled water. Aliquots of this solution were treated as indicated under Section 2.3.

3. Results and discussion

3.1. Selection of the sensor phase and regenerative solution

The strongly basic anion and cation-exchanger resins and non-ionic resins commented in Section 2.1 (reagents) were studied. Only some of them were useful to retain the analyte (see Table 1) and the best difference between noise and fluorescence signals was obtained using Amberlite XAD7.

The effect of the grain size of the selected solid support was also tested. All of the grain sizes produce similar responses but the measured error decreases from 40–63 to 80–120 and increases from 80–120 to >160 . Thus, $80\text{--}120 \mu\text{m}$ was chosen because it produces adequate optosensor responses with the lowest error.

Finally, studies of optimum regenerative solution were carried out to transform the system into a reusable one. Different acids and base solutions (2 and 6 M NaOH and 6 M HCl , HNO_3 and H_2SO_4) and organic solvents (methanol, ethanol, acetonitrile, dimethylformamide and acetone) were tested. The optimum regenerative solution was acetone ($250 \mu\text{L}$).

Table 1
Selection of solid support

Resin ^a	Optosensor response	
	pH 4.0	pH 10.0
Amberlite XAD 7	1.318	1.469
Silica Gel "Merck"	0.131	0.793
Silica Gel "Davisil"	0.495	1.057
SP-Sephadex	0.983	0.957
QAE-Sephadex	0.283	0.300

The bold numbers means they are the maximum signal obtained using Amberlite XAD7.

^a Only the resins which interact with NPZ.

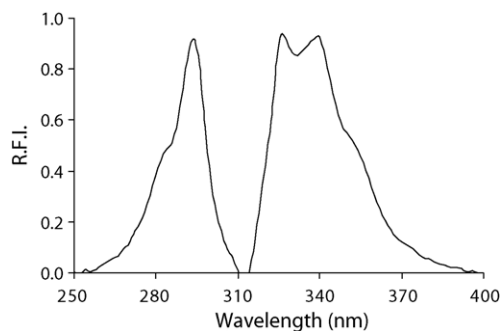


Fig. 1. Excitation and emission fluorescence spectra of naphazoline on Amberlite XAD-7, [NPZ] = 200 ng mL⁻¹, detector voltage 750 V, slit width_{exc/nm} 4/4 nm and resolution 5 s.

3.2. Luminescence properties on solid surface

The fluorescence excitation and emission spectra of NPZ on Amberlite XAD7 are shown in Fig. 1. The maximum fluorescence emission is obtained when it is excited at 294 nm and the emission fluorescence is collected at 326 nm. These wavelengths are very similar to the corresponding ones in solution (290/328 nm).

3.3. Optimization of chemical variables

The chemical variables, which affect fluorescence signals, are the pH and the type and concentration of buffer solution. pH affects the dissociation of the compounds, and consequently the retention on the solid support and the fluorescence intensity emission.

Different pHs ranging from 2 to 12 (fixed with HCl and/or NaOH) were studied (see Fig. 2a), choosing pH 8.0 as optimum value.

Different pH 8.0 buffer solutions (glycine/NaOH, borax/HCl and H₂PO₄⁻/HPO₄²⁻) added only in the sample, only in the carrier and in both solutions were tested. The best optosensor response was obtained with glycine/NaOH buffer solution in the sample and the carrier solutions.

Different concentrations of buffer solutions were also tested (see Fig. 2b). An increase in the buffer concentration produces a decrease in the optosensor response but also diminishes the error. Thus, the selected buffer concentration was 10 mM.

3.4. Optimization of flow injection parameters

The retention of NPZ on the solid support changes with the carrier flow-rate from 0.5 to 3 mL min⁻¹. An increase in the flow-rate decreases the luminescence signal up to 1.5 mL min⁻¹ and then when the flow-rate increases the optosensor response is constant but decreases the response time. An optimum value of 2.5 mL min⁻¹ was chosen because it shows an adequate fluorescence signal with the lowest response time.

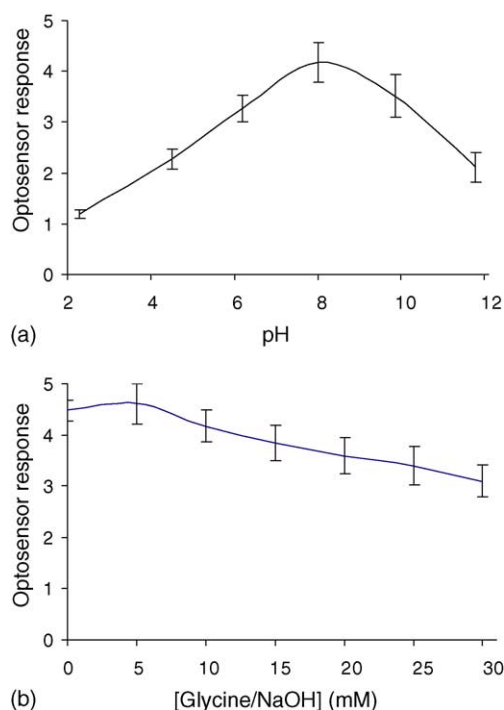


Fig. 2. Optimisation of chemical variables (a) pH and (b) concentration of glycine/NaOH buffer solution in the sample and the carrier solutions. [NPZ] = 200 ng mL⁻¹, $\lambda_{exc/nm}$ = 290/328 nm, detector voltage 750 V, slit width_{exc/nm} 4/4 nm and resolution 5 s.

The injection volume of sample considerably affects the optosensor response and the response time. An increase in the injection volume significantly increases the luminescence signal (resulting in a plateau when injection volume is greater than 3 mL) and also increases the response time. In order to have a non-excessive response time and an acceptable signal, 2 mL was chosen as optimum injection volume.

3.5. Analytical performance characteristics

A standard calibration linear graph was prepared according to recommended procedures. The calibration line was fitted by least-square regression for NPZ: $I = 0.4147 + 0.0202C$; where C is the concentration in ng mL⁻¹ of NPZ and I is the optosensor response. The correlation coefficient (r) was 0.9970.

The linear dynamic range and detection and quantification limits were determined using the IUPAC methods and the precision was expressed as relative standard deviation. All of these analytical characteristics are summarised in Table 2.

3.6. Interference study

To demonstrate the selectivity of the proposed optosensor, the emission spectrum of the medicines were compared to the emission spectrum of the pure analyte and both spectra are practically the same. A standard addition method of calibration was also carried out demonstrating that the optosensor

Table 2
Analytical parameters

Parameter	Value
Linear range (ng mL ⁻¹)	2.6–225.0
Detection limit (ng mL ⁻¹)	2.6
Quantification limit (ng mL ⁻¹)	8.7
R.S.D. (%)	2.0 ^a

^a At 125 ng mL⁻¹ level.

for determining NPZ in pharmaceutical preparations is very selective.

3.7. Analytical applications

Following the procedure for analysing medicines, two pharmaceutical preparations (Colirio Alfa and Euboral Oftálmico) were analysed. Table 3 shows the experimental results.

The method was also validated with a standard addition method of calibration. To check the similarity of the slopes, a Student's *t*-test was used [21]. The statistic for the slope was calculated using the fluorescence optosensor 0.164 for Colirio Alfa and 1.386 for Euboral Oftálmico while the statistic for the slopes tabulated are 2.756 at 29 d.f. and $\alpha = 0.01$. Therefore, the slopes are essentially the same.

Table 3
Comparative study of recoveries in pharmaceutical samples by RTF- and RTP-sensors

Pharmaceutical preparations	Sensor	Direct determination		Standard addition method determination
		Recovery percentage (%)	R.S.D. (%) ^a	Recovery percentage (%)
Colirio Alfa	RTF	99.2	6.8	106.9
	RTP ^b	104.9	9.4	121.2
Euboral Oftálmico	RTF	100.1	1.5	107.8
	RTP ^b	101.4	8.9	80.9

^a For seven replicates.

^b Reference [20].

Table 4
Figures of merit for different analytical methods for NPZ in pharmaceutical preparations

Method	LOD (ng mL ⁻¹)	LOQ (ng mL ⁻¹)	LDR (ng mL ⁻¹)	RSD (%) ^a	Reference
Photometry	20 × 10 ⁹	60 × 10 ⁹	0–1000 × 10 ⁹	–	[3]
HPLC	20 × 10 ³	60 × 10 ³	–	–	[6]
CZE	4700.0	15800.0	0–60000	1.1	[8]
MEKC	50.0	150.0	0–32300	2.2	[9]
MEKC-PLS	30.0	90.0	0–39900	2.5	[10]
Atomic emission	980.0	2940.0	0–14760	1.5	[11]
Fluorescence	100.0	300.0	0–3000	–	[12]
Fluorescence-CD	15.0	45.0	–	–	[13]
MS-RTP	4.9	16.3	0–1000	2.1	[14]
HAI-RTP	1.7	5.6	0–1000	1.1	[15]
RTP-sensor	9.4	31.2	0–1000	2.3	[20]
RTF-sensor	2.6	8.7	0–225	2.0	This work

Abbreviations: LOD: limit of detection; LOQ: limit of quantification; LDR: linear dynamic range; RSD: relative standard deviation; CZE: capillary zone electrophoresis; MEKC: Micellar electrokinetic chromatography; CD: cyclodextrine; RTF: room temperature fluorescence.

^a In an average concentration level in the calibration curve.

3.8. Comparison between both developed devices

In this section, the performance characteristics of the proposed optosensor will be compared with the published methods for determining NPZ.

3.8.1. Figures of merit

Table 4 shows the HAI-RTP method which presents the best detection and quantification limits but is followed very closely by the fluorescence sensor. All of the methods offer similar precision and as far as the LDR is concerned, the proposed sensor has the lowest range and this is the only disadvantage it presents compared to the other methods.

3.8.2. Time and cost per analysis

The fastest separative method takes at least 10 min to determine NPZ and its cost is always higher than luminescence methods. The off-line photometry, fluorimetry and phosphorimetry methods take practically the same time but they are normally longer than on-line (flow) methods. Therefore, the fastest and cheapest methods are RTF- and RTP-sensors. RTP-sensor takes 100 s for analysing one sample while RTF-sensor takes only 80 s.

3.8.3. Portability, potential for miniaturization and cost of manufactured

On the one hand, the fluorescence optosensor, which needs a continuous lamp and a photomultiplier as detector, presents a higher potential for its miniaturization and lower manufacturing costs than the phosphorescence sensor, which needs a pulsed lamp and an electronic table to program the decay time and the gate time into the detector. On the other hand, the phosphorescence optosensor presents the largest Stoke's shift, 230 nm, whilst for the fluorescence sensor it is only 32 nm.

3.8.4. Applicability

The RTF- and RTP-sensors were applied to determine NPZ in the same pharmaceutical preparations. Table 3 shows the results obtained with both sensors. It shows that the RTF has the best recovery percentage in the direct and standard addition determinations and the reproducibility of the RTP-sensor is worse than the fluorescence sensor.

4. Conclusions

The first fluorescence optosensor for the on-line determination of NPZ is presented offering excellent analytical parameters, such as sensitivity, selectivity, versatility, applicability and ease of use.

This fluorescence-based optosensor, developed for the determination of NPZ, has been compared with the published methods to determine NPZ and it has been proved to be accurate and suitable for NPZ detection. The optosensor is characterized by its reproducibility of the baseline after each single measurement cycle and it responds rapidly.

For the two kinds of commercial products tested, the statistical calculations of the assay results showed satisfactory precision of the luminescence optosensor proposed with no significant differences between the declared and experimental results. The proposed method can be recommended for the routine determination of NPZ in formulations, as it is rapid and simple, and the results obtained showed good precision.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the financial support of the FPU Grant of Ministry of Education and Science (Ref. AP2002-1033), the financial support of a work contract from the Junta de Andalucía (Financial support for post-doctoral courses in universities outside Andalucía) and Project MAT 2003-09074-C02-01 of Ministry of Science and Technology.

References

- [1] A. Goodman-Hillman, T. Rall, A. Nier, P. Taylor, *The Pharmacological Basic of Therapeutic*, McGraw-Hill, New York, 1996.
- [2] H. Goicoechea, A. Olivieri, *Anal. Chim. Acta* 453 (2002) 289–300.
- [3] K.M. Kelani, *J. AOAC Int.* 81 (1998) 1128–1134.
- [4] S. Goenechea, *J. Chromatogr.* 36 (1968) 375–377.
- [5] M. Massaccesi, *Pharm. Acta Helv.* 62 (1987) 302–305.
- [6] R. Bocic, C. Vallejos, A. Álvarez-Luege, F. López, *J. AOAC Int.* 75 (1992) 902–904.
- [7] S.C. Ruckmick, D.F. Marsh, D.T. Duong, *J. Pharm. Sci.* 84 (1995) 502–507.
- [8] A.F. Marchesini, M.R. Williner, V.E. Mantovani, J.C. Robles, H.C. Goicoechea, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 31 (2003) 39–46.
- [9] J.M. Lemus Gallego, J. Perez Arroyo, *J. Chromatogr. B* 784 (2003) 39–47.
- [10] J.M. Lemus Gallego, J. Perez Arroyo, *J. Sep. Sci.* 26 (2003) 947–952.
- [11] S. Khalil, *Mikrochim. Acta* 130 (1999) 181–184.
- [12] J.L. Manzoori, M. Amjadi, *Indian J. Chem. A* 42 (2003) 2988–2992.
- [13] S.L. McCall, J.D. Winefordner, *Anal. Chem.* 55 (1983) 391–393.
- [14] A. Segura Carretero, C. Cruces Blanco, B. Cañabate Díaz, A. Fernández Gutiérrez, *Analyst* 123 (1998) 1069–1071.
- [15] A. Fernández Gutiérrez, A. Segura Carretero, B. Cañabate Díaz, C. Cruces Blanco, *Appl. Spectrosc.* 53 (1999) 741–744.
- [16] J.F. Fernández Sánchez, A. Segura Carretero, C. Cruces Blanco, A. Fernández Gutiérrez, *Anal. Chim. Acta* 462 (2002) 217–224.
- [17] J.F. Fernández-Sánchez, A.S. Carretero, C. Cruces-Blanco, A. Fernández-Gutiérrez, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 31 (2003) 859–865.
- [18] Y. Yang, X. Yang, C.X. Jiao, H.F. Yang, Z.M. Liu, G.L. Shen, R.Q. Yu, *Anal. Chim. Acta* 513 (2004) 385–392.
- [19] I.P. Re guera, M.G. Rubio, A.M. Molina, *Anal. Sci.* 20 (2004) 799–803.
- [20] B. Cañabate Díaz, S. Casado Terrones, A. Segura Carretero, J.M. Costa Fernández, A. Fernández Gutiérrez, *Anal. Bioanal. Chem.* 379 (2004) 30–34.
- [21] L. Cuadros Rodríguez, A.M. García Campaña, F. Alés Barrero, C. Jiménez Linares, M. Román Ceba, *J. AOAC Int.* 78 (1995) 471–476.

The development and comparison of a fluorescence and a phosphorescence optosensors for determining the plant growth regulator 2-naphthoxyacetic acid

S. Casado-Terrones^a, J.F. Fernández-Sánchez^b, A. Segura-Carretero^{a,*},
A. Fernández-Gutiérrez^a

^a Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Granada, C/Fuentenueva s/n, E-18071 Granada, Spain

^b Center for Chemical Sensors, Swiss Federal Institute of Technology Zurich (ETHZ), Technoparkstrasse 1, CH-8005 Zürich, Switzerland

Received 10 September 2004; received in revised form 14 December 2004; accepted 16 December 2004

Available online 25 January 2005

Abstract

We describe two luminescence methods based on a flow-through optical sensor. A fluorescence and a phosphorescence optosensors have been developed and compared. Both techniques are fast (response time of 150 and 90 s, respectively) and simple. The fluorescence optosensor is based on the on-line immobilization of 2-naphthoxyacetic acid (β -NOA) on a non-ionic resin (Amberlite XAD-7) solid support in a continuous-flow system (10 mM glycine/HCl buffer solution at pH 2.5) and the phosphorescence one on the on-line immobilization of β -NOA on silica gel solid support in a 175 mM TiNO₃ and 10 mM Na₂SO₃ continuous-flow system. Fluorescence and phosphorescence intensities were measured at $\lambda_{exc/em} = 328/348$ and 276/516 nm, respectively. The fluorescence optosensor was sensitive to a linear concentration range of between 2.0 and 225.0 ng mL⁻¹ with a detection limit of 2.0 ng mL⁻¹ and a standard deviation of 2.8% at 125 ng mL⁻¹, and for the phosphorescence a linear concentration range between 4.9 and 250.0 ng mL⁻¹, a detection limit of 4.9 ng mL⁻¹ and a standard deviation of 2.23% at 150 ng mL⁻¹. Also, a study of applicability was carried out obtaining recovery percentages around 100% with standard deviations slower than 2.2%.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Fluorescence sensor; Phosphorescence sensor; 2-Naphthoxyacetic acid

1. Introduction

2-Naphthoxyacetic acid (β -NOA) is a kind of plant growth regulator, especially for grapes, apples, tomatoes, etc. It is included in auxino-similar phytodrugs because its structure resembles to that of auxine, a plant hormone, which controls the growth of stems, roots, flowers and fruits, and can also improve fruits and vegetables as much in size as in colour. Furthermore, auxino-similar phytodrugs guarantee a relatively low environmental impact.

The main objective in the analysis of plant growth regulators is the control of the agricultural crops usually consumed

by human beings. Several country regulations permit relatively high tolerance levels, due to their low toxicity. Despite being not very toxic substances, they could be hazardous if their consumption is carried out in high quantities.

This hormone can be determined by HPLC methods [1–6] and capillary electrophoresis [7]. Luminescent analysis is also used, only a few of them based on fluorescent measurements [8,9] and the majority using phosphorimetry [10–14].

All of the published methods for determining β -NOA are expensive, spend too much time or they are not in continuous devices. So they are not suitable to use in routine control laboratories. To solve these problems, the development of optosensor (the combination of flow-injection techniques with detection on optically active surfaces packed in a flow-through cell [15]) has proved to offer important advantages

* Corresponding author. Tel.: +34 958243296; fax: +34 958249510.

E-mail address: ansegura@ugr.es (A. Segura-Carretero).

due to its high sensitivity and selectivity, precision, simplicity, speed and low cost [16].

The growing number of published papers about fluorescence optosensors in last few years clearly indicates the advantages of these ones [17–20]. Nevertheless, room temperature phosphorescence optosensing methods have been developed to determine analytes such as oxygen, (transition) metals, lanthanides, organic compounds and enzyme substrates such as glucose and their detection (direct or indirect) is based on the formation of analyte complexes [21]. Only one paper appears in the literature, which permits the direct phosphorescence determination of naphazoline without any aggregate formation [22]. So, the naphazoline is determined directly using its intrinsic phosphorescence emission.

Any sensor has been published for determining β -NOA and only one direct phosphorescence sensor appears in the literature. For this reason, we have developed a fluorescence optosensor to determine β -NOA and a room temperature phosphorescence optosensor which can measure directly an organic compound (β -NOA) without forming any kind of aggregation. Also, we compared both sensors showing their advantages and disadvantages.

2. Experimental

2.1. Reagents

All experiments were performed with analytical-reagent grade chemicals, pure solvents and bi-distilled water.

β -NOA (Sigma Spain) was used without further purification. Working solutions were daily prepared by suitable dilution of the stock solution (48 mg L^{-1}).

Potassium iodide, potassium bromide, potassium chloride, thallium nitrate and sodium sulphite anhydrous (Sigma Spain) were used as received, as well as glycine, potassium hydrogen phthalate and sodium di-hydrogen phosphate 1-hydrate (Sigma Spain).

The sodium sulphite solutions were prepared daily and kept in tight containers. Glycine/HCl, ftalate/HCl and

$\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{HCl}$ 10 mM buffer solutions at pH 2.5 were prepared.

As solid supports we tested two types of resins: ion-exchanging and non-ionic-exchanging (Sigma Spain). The basic anion-exchanger resins Dowex 1 (1×2 , 1×4 , 1×8), QAE-Sephadex and DEAE-Sephadex, the acid cation-exchanger resins Dowex 50 w ($50 \text{ w} \times 2$, $50 \text{ w} \times 4$, $50 \text{ w} \times 8$), SP-Sephadex and CM-Sephadex, and the non-ionic exchanger resins Amberlite XAD (XAD 2, XAD 4, XAD 7), Silica Gel 'Davisil' and Silica Gel 'Merck' were sieved and then tested at five grain size ($40\text{--}63$, $63\text{--}80$, $80\text{--}120$, $120\text{--}160$ and $>160 \mu\text{m}$), except all Sephadex that were sieved until $120 \mu\text{m}$.

2.2. Optosensing manifold and instrumentation

A $25 \mu\text{l}$ Hellma 176.052-QS flow-through cell was packed with the appropriate reagent phase and placed in the conventional sample compartment of the instrument in a single-line flow-injection system (Fig. 1). A rotary valve (A) (Supelco 5020) was used to introduce the sample in the fluorescence and phosphorescence optosensors and only for the fluorescence optosensor a second valve (B) is used to regenerate the active surface. PTFE tubing (0.8 mm i.d.) and fittings were used to connect the flow-through cell. A Gilson Minipuls-3 peristaltic pump was used to generate the flow stream.

All fluorescence measurements, fluorescence spectra and relative fluorescence intensity (RFI), were carried out with an Aminco Bowman (Rochester, NY, USA) Series 2 luminescence spectrometer fitted with a continuous high-power xenon lamp.

A Varian Cary-Eclipse Phosphorescence Spectrophosphorimeter (Varian Iberica, Madrid, Spain) fitted with a xenon discharge lamp (75 kW) was used to obtain the phosphorescence spectra and all the relative phosphorescence intensity measurements (RPI).

2.3. General procedure for the fluorescence optosensor

Samples were prepared by adding to the analyte 10 mM glycine/HCl at pH 2.5. Two millilitres of the sample

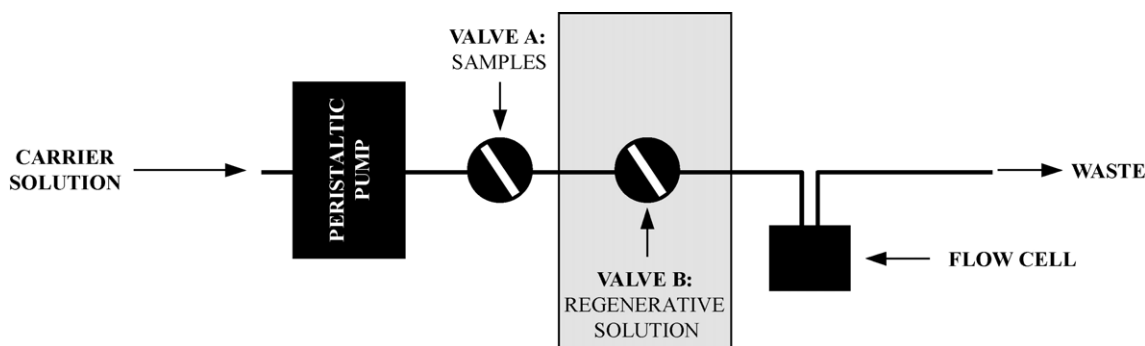


Fig. 1. Flow manifold used for both optosensors (valve B is omitted in the phosphorescence optosensor).

was injected through valve A into a channel of 10 mM glycine/HCl buffer solution at pH 2.5. The β -NOA was kept in the flow cell in this medium at a 2.0 mL min^{-1} flow rate on Amberlite XAD 7 and the fluorescence was measured at $\lambda_{\text{exc/em}} = 328/348 \text{ nm}$. Two hundred and fifty microlitre of regenerative solution (acetone) was injected through valve B to strip the retained analyte from the reagent phase before proceeding with the next sample. The measurements were repeated three times to evaluate any response error in the optosensor.

2.4. General procedure for the phosphorescence optosensor

Samples were prepared by adding to the analyte 175 mM TiNO_3 and 10 mM Na_2SO_3 . One millilitre of the sample was injected through valve A into a channel of 175 mM TiNO_3 and 10 mM Na_2SO_3 . The β -NOA was kept in the flow cell in this medium at a 1.5 mL min^{-1} flow rate on Silica Gel 'Merck' and the phosphorescence was measured at $\lambda_{\text{exc/em}} = 276/516 \text{ nm}$. No regenerative solution is necessary, the analyte fixation on the resin was not so strong and the carrier stream elutes the analyte itself from the reagent phase. The measurements were repeated three times to evaluate any response error in the optosensor.

2.5. Procedure for soil samples

For both optosensors, 5 g of soil sample were mashed and spiked with 125 ng mL^{-1} of β -NOA, after 70 mL of acetone were added to extract it from the soil. The mixture was filtered by graviness and washed two times with 10 mL portions of acetone. The filtrate was transferred to a 100 mL standard flask and diluted to volume with acetone. That extract was taken to dryness in a rotary evaporator, and after that to a 100 mL standard flask with distilled water at the optimum experimental conditions. This solution was treated as indicated under general procedure.

3. Results and discussion

3.1. Selection of the sensory phase and regenerative solution

Basic anion-exchanger resins (Dowexs 1, QAE and DEAE Sephadexs), acid cation-exchanger resins (Dowexs 50w, SP and CM Sephadexs) and non-ionic-exchanger resins (Amberlites XAD, Silica Gel 'Davisil' and Silica Gel 'Merck') were tested at a grain size of 63–80 μm .

The interaction between the analyte and the resins is affected by the pH. So, for the fluorescence optosensor, two different pH values 2.5 and 10 (lower and higher than β -NOA's pK_a) were fixed in the sample and the carrier stream using HCl and/or NaOH. For the phosphorescence optosensor is not possible to use pH around 2.5 (deoxygenating action is not sufficient at pH values smaller than 6), so the sample only was prepared at pH 10 adding NaOH. Table 1 shows the optosensor responses for each pH, the biggest differences between noise and fluorescence or phosphorescence signals were obtained using Amberlite XAD 7 for the fluorescence optosensor and Silica Gel 'Merck' for the phosphorescence one.

All solid supports were studied at the grain size that they were sieved, and it was observed that a decrease of grain size improves analytical signal, but the limit size of grain is imposed by the pressure produced into the flow system. Thus, although 40–63 μm gave the maximum signal, 63–80 μm was chosen as suitable mesh size to avoid extra-pressure in both optosensors.

Finally, to make the fluorescence system satisfactorily reusable, different regenerative solution (inorganic strong acid and base solutions and organic solvents) were tested. The best regenerative solution was acetone (250 μL).

3.2. Spectral characteristics

Fig. 2 shows the fluorescence and phosphorescence excitation and emission spectra of β -NOA in solution and on the solid support. For both optosensors the pre-concentration of

Table 1
Selection of solid support

Resin	Normalised fluorescence optosensor response		Normalised phosphorescence optosensor response
	pH 2.5	pH 10	pH 10
Amberlite XAD 2	83.6	11.7	–
Amberlite XAD 4	90.7	48.9	–
Amberlite XAD 7	100	2.70	–
Silica Gel 'Merck'	3.5	–	100
Silica Gel 'Davisil'	–	–	65.1
SP-Sephadex	0.9	0.5	–
Dowex 1 \times 2	4.8	–	–
Dowex 1 \times 4	1.4	0.5	17.5
Dowex 1 \times 8	0.9	–	63.5
QAE-Sephadex	6.91	38.7	–

–: The analyte do not interact with the solid support.

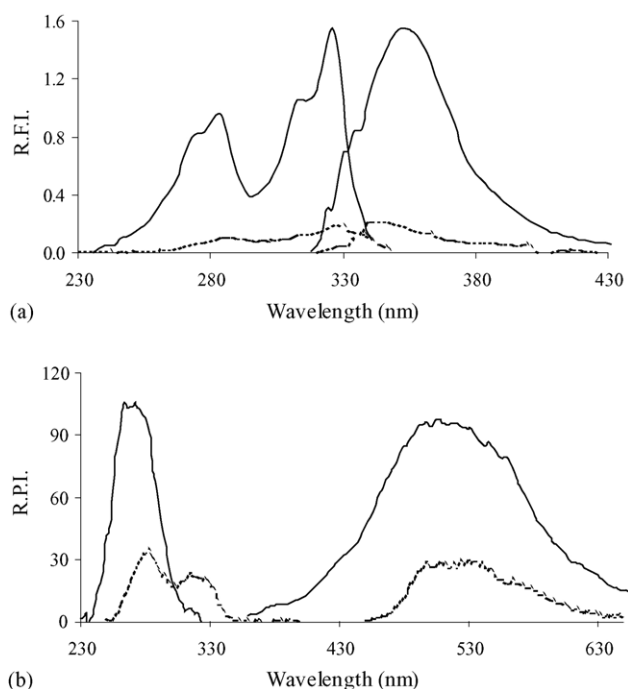


Fig. 2. (a) Excitation and emission fluorescence spectra of β -NOA in solution (---) and on the solid support, Amberlite XAD 7 (—). [β -NOA] = 500 ng mL⁻¹, 10 mM glycine/HCl buffer solution at pH 2.5, detector voltage 650 V and slits_{exc/em} 4/4 nm. (b) Excitation and emission phosphorescence spectra of β -NOA in solution (---) and on the solid support, Gel Silica 'Merck' (—). [β -NOA] = 500 ng mL⁻¹, 10 mM Na₂SO₃ and 175 mM TiNO₃, detector voltage 850 V, slits_{exc/em} 20/20 nm, delay time 0.120 ms and gate time 5 ms.

the analyte on the solid support is clearly demonstrated in this figure.

β -NOA on Amberlite XAD 7 emits fluorescence with maximum excitation intensities at 328 nm and maximum emission intensity at 348 nm. On Silica Gel 'Merck', the optima phosphorescence wavelengths for β -NOA are 276/516 nm.

Different instrumental parameters relating to the luminescence technique, which affect the fluorescence and phosphorescence intensities, were carefully optimized. Table 2 shows the optima parameters used.

3.3. Optimization of chemical variables for the fluorescence optosensor

The chemical variables, which affect to fluorescence signals, are summarized in Table 3.

Table 2
Optima instrumental parameters

	Fluorescence optosensor	Phosphorescence optosensor
$\lambda_{exc/em}$ (nm)	328/348	276/516
Detector voltage (V)	650	850
Slits _{exc/em} (nm)	4/4	20/20
Total decay time (s)		0.01
Delay time/gate time (ms)		0.120/5

Table 3
Optima chemical variables for both optosensors

	Fluorescence optosensor	Phosphorescence optosensor
pH (in sample and carrier)	2.5	8
Buffer solution	Glycine/HCl	Not necessary
[Buffer solution] (mM)	10	—
Heavy atom perturber		TiNO ₃
[Heavy atom perturber] (mM)		175
[Na ₂ SO ₃] (mM)		10

pH affects the dissociation of the compound and consequently the retention on the resin and the fluorescence emission intensity.

Different pHs ranging from 1.3 to 11 (fixed with HCl and/or NaOH) were studied with a solution of a fixed amount of β -NOA (300 ng mL⁻¹) under the optima conditions. Under these conditions, fluorescent signal of β -NOA decreases with an increase of pH, choosing 2.5 as the optimum pH value because at this pH is possible to use a conventional buffer solution. Fig. 3 shows the effects of pH on the fluorescence optosensor response.

Glycine/HCl, fthalate/HCl and NaH₂PO₄/HCl 10 mM buffer solutions at pH 2.5 were tested. The best optosensor response was obtained with glycine/HCl buffer solution. Also, different concentrations of glycine/HCl buffer solutions were also tested and the optimum concentration was 10 mM.

3.4. Optimization of chemical variables for the phosphorescence optosensor

Table 3 shows the optima chemical variables selected for the phosphorescence optosensor. The chemical variables, which affects the phosphorescence emission are type and concentration of heavy atom perturber, concentration of oxygen scavenger (sodium sulphite) and pH.

Different concentrations of heavy atoms perturber (KCl, KBr, KI, TiNO₃, Pb(NO₃) and AgNO₃) were studied. Pb(NO₃) and AgNO₃ precipitated in the presence of sulphite

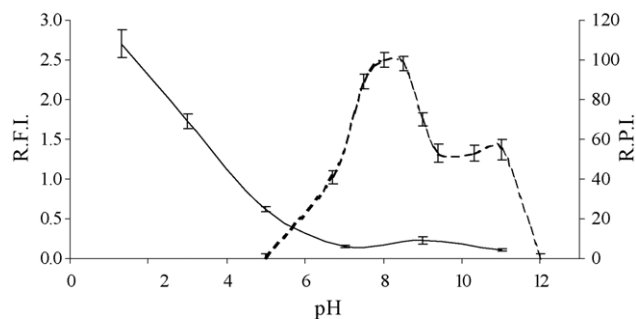


Fig. 3. Effect of pH on the fluorescence (—) and phosphorescence (---) signals. For fluorescence optosensor: [β -NOA] = 300 ng mL⁻¹, $\lambda_{exc/em}$ 328/348 nm, detector voltage 650 V, slits_{exc/em} 4/4 nm, flow rate 2 mL min⁻¹ and injection volume 2 mL. For phosphorescence optosensor: [β -NOA] = 150 ng mL⁻¹, $\lambda_{exc/em}$ 276/516 nm, detector voltage 850 V, slits_{exc/em} 20/20 nm, flow rate 1.5 mL min⁻¹ and injection volume 1 mL.

in an irreversible way, so they could not be used; while, with KCl and KBr no phosphorescence signals were observed. KI and TINO₃ were the two heavy atoms giving useful signal. The maximum intensities are obtained using TINO₃ at a concentration of 175 mM.

Sulphite ion can be used as an efficient oxygen scavenger to minimize RTP quenching. Different amounts of sodium sulphite were added to a solution with a fixed amount of β -NOA and heavy atom salt while the concentration of sodium sulphite was varied from 0 to 20 mM. The concentration of β -NOA was 150 ng mL⁻¹ and 175 mM for TINO₃, with appropriate amounts of 0.1 M sodium sulphite stock solution, to obtain the final desired concentration. Finally, 10 mM concentration of Na₂SO₃ was selected as optimum level.

pH affects the phosphorescence signal and also affects the deoxygenating system, so different pHs ranging from 5 to 12 were studied under optimum conditions. Fig. 3 shows the experimental results.

pH 8 was selected as the optimum pH. The pH which has the sample when the analyte, the heavy atom perturber and the oxygen scavenger added is 8.12, for these reason is not necessary to use any buffer solution to set the sample and carrier's pH.

3.5. Flow injection analysis parameters

The β -NOA retention on the resin changes according to the carrier flow rate. An increase of flow rate decreased significantly the luminescence signal but also decreases the response time of the sensor (time passed between injection and maximum intensity measurement). Thus, an optimum value of 2 and 1.5 mL min⁻¹ were chosen for the fluorescence and the phosphorescence optosensors, respectively.

The injection volume of sample considerably affects the emission signals. An increase in injection volume of up 3.0 mL increases the luminescence signal (resulting in a plateau when injection volume is greater than 3 mL) but the response time is increasing too. Therefore, an injection volume of 2 and 1 mL were chosen as optimum injection volumes for the fluorescence and the phosphorescence optosensors, respectively.

3.6. Analytical performance characteristics

Standard linear calibration graphs were drawn according to recommended procedures. All the features of the proposed optosensors are summarised in Table 4. The wide linear range, small standard errors and correlation coefficient indicate very good calibration linearity in both cases. The detection and quantification limits were determined using the IUPAC method and the precision was expressed as relative standard deviation.

The characteristics of these methods were compared with those of HPLC, GC, capillary zone electrophoresis with UV detection (CZE-UV), fluorescence and micellar stabilised (MS), microemulsion (ME) and heavy atom induced

Table 4
Analytical parameters of proposed optosensors

Parameter	Fluorescence optosensor	Phosphorescence optosensor
Slope	0.02	0.77
Intercept	0.34	-4.70
Correlation coefficient	0.997	0.997
Linear range (ng mL ⁻¹)	2.0–225	4.9–250
Limit of detection (ng mL ⁻¹)	2.0	4.9
Limit of quantification (ng mL ⁻¹)	6.7	16.4
R.S.D. (%)	2.8 ^a	2.2 ^b

^a At 125 ng mL⁻¹ level.

^b At 150 ng mL⁻¹ level.

(HAI) room temperature phosphorescence (RTP) methods in Table 5.

3.7. Applications of the optosensors

To test the predictive ability of the proposed optosensors, a sample of soil from the city of Granada was subdued to the procedure for soil samples and general procedure.

Results present good recovery percentages (90.0 and 104.1%) with relative standard deviations of 1.81 and 2.13% (for seven replicates) for the fluorescence and phosphorescence optosensors, respectively.

3.8. Comparison between the developed devices

Once assembled the two different optosensors, optimised the instrumental and experimental conditions and evaluated their applicability to real sample analysis, some of the performance characteristics of both will be compared.

3.8.1. Optosensing manifold

For the fluorescence optosensor is necessary to make a two valves (one for the sample injection and other for regenerate the sensory phase) flow system. Nevertheless, the phosphorescence devices only need a valve. This physical aspect affects to the time of measurement.

3.8.2. Time of measurement

For the fluorescence optosensor is necessary to inject the sample, wait for the optosensor response and then, inject the

Table 5
Detection limits comparison with other proposed methods

Analytical method	Detection limit (ngcmL ⁻¹)	Reference
Fluorescence optosensor	2.0	This work
Phosphorescence optosensor	4.9	This work
IIR-HPLC	20.0	[6]
GC-intra-injector	20.0	[6]
GC-pre-injection	100.0	[6]
CZE-UV	860.0	[7]
Fluorescence	1.2	[9]
MS-RTP	130.0	[11]
ME-RTP	243.0	[12]
HAI-RTP	30.5	[13]

regenerative solution and wait for the stabilisation and conditioning of the sensory phase. For the phosphorescence device is only necessary to inject the sample, wait for the optosensor response and simultaneously, the carrier stream is regenerating the solid support. So, the minimum necessary times between two injections in the fluorescence and phosphorescence optosensors are 235 and 200 s, respectively.

3.8.3. Portability and potential for miniaturization

Fluorescence optosensor, which needs a continuous lamp and a photomultiplier as detector, presents a higher potential for its transformation in a portable instrument compared with the phosphorescence one, which needs a pulsed lamp and an electronic table to program the decay time and the gate time into the detector. On the other hand, the phosphorescence optosensor present the highest spectral resolution between excitation and emission wavelengths, 240 nm, while the fluorescence one is only 20 nm. This aspect simplifies the construction of the phosphorescence optosensor's optical devices.

3.8.4. Figures of merit

As can be seen in Table 4, slight better detection limit was obtained with the fluorescence optosensor. On the other hand, both devices offer similar precision and linear dynamic range for the determination of β -NOA.

3.8.5. Applicability

As can be seen in Section 3.7, the two devices present good recovery percentages and similar relative standard deviations, so under this aspect is not any difference between the two developed optosensors.

4. Conclusions

We present the first two optosensors for the on-line determination of β -NOA. One of these, it is the second optosensor published that determine directly a phosphorescence molecule, without any intermediate aggregate. The proposed methods offer excellent analytical parameters, such as sensitivity, selectivity, versatility and ease of use. Also, we have carried out a critical comparison between the two optosensors developed indicating the advantages and disadvantages for each one.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the financial support of the FPU Grant of Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (Ref. AP2002-1033), the financial support of a work contract of Junta de Andalucía (Ayuda para el Perfeccionamiento de Doctores en Universidades Fuera de Andalucía) and Project MAT 2003-09074-C02-01 of Ministerio de Ciencia y Tecnología.

References

- [1] T.E. Archer, J.D. Stokes, Residue analysis of beta-naphthoxyacetic acid and beta-naphthol by high-pressure liquid-chromatography, *J. Agric. Food Chem.* 26 (1978) 452–455.
- [2] T.E. Archer, J.D. Stokes, Levels of beta-naphthoxyacetic acid and beta-naphthol on field sprayed strawberries as analyzed by high-pressure liquid-chromatography, *J. Agric. Food Chem.* 26 (1978) 1465–1466.
- [3] T.E. Archer, J.D. Stokes, Residue analysis of beta-naphthoxyacetic acid and beta-naphthol on field-sprayed tomatoes by high-pressure liquid-chromatography, *J. Agric. Food Chem.* 28 (1980) 877–880.
- [4] T.E. Archer, J.D. Stokes, Total residues of 2-naphthoxyacetic acid, 2-(6-hydroxynaphthoxy) acetic acid, and 2-(7-hydroxynaphthoxy) acetic acid in tomato plants and fruit by high-performance liquid-chromatography, *J. Agric. Food Chem.* 36 (1988) 1307–1309.
- [5] V. Gokmen, J. Acar, Liquid chromatographic determination of beta-naphthoxyacetic acid in tomatoes, *J. Chromatogr. A* 798 (1998) 167–171.
- [6] M.C. Gennaro, E. Marengo, V. Gianotti, S. Angioi, G. Copeta, Intercalibration of chromatographic methods for auxino phytochemicals in Solanaceae, *J. Chromatogr. A* 993 (2003) 111–119.
- [7] A. Segura Carretero, C. Cruces-Blanco, M.S. Pena, S.C. Ramirez, A.F. Gutierrez, Determination of phytohormones of environmental impact by capillary zone electrophoresis, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 1419–1422.
- [8] A.W. Davidson, Note on spectrophotofluorometric determination of beta-naphthoxyacetic acid, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 53 (1970) 179.
- [9] F.G. Sánchez, C.C. Blanco, A direct spectrofluorimetric method for the determination of beta-naphthoxyacetic acid residues in strawberries, *Anal. Lett.* 21 (1988) 889–899.
- [10] N.L. Trautwein, J.C. Guyon, Determination of the pesticides 2,4-d,2-naphthoxyacetic acid, and silvex by low-temperature phosphorimetry, *Mikrochim. Acta* 1 (1983) 413–418.
- [11] A.S. Carretero, C. Cruces Blanco, A.F. Gutiérrez, Determination of the plant growth regulator β -naphthoxyacetic acid by micellar-stabilized room temperature phosphorescence, *Talanta* 43 (1996) 1001–1007.
- [12] A.S. Carretero, C.C. Blanco, A.F. Gutiérrez, Application of derivative-variable-angle synchronous scanning phosphorimetry in a microemulsion medium for the simultaneous determination of 2-naphthoxyacetic acid and 1-naphthalenacetamide, *Analyst* 122 (1997) 925–929.
- [13] A.S. Carretero, C.C. Blanco, A.F. Gutiérrez, Heavy atom induced room temperature phosphorescence method for the determination of the plant growth regulator β -naphthoxyacetic acid, *J. Agric. Food Chem.* 46 (1998) 3683–3686.
- [14] L.D. Li, X. Hai, A.J. Tong, Study on using I- as heavy atom perturber in cyclodextrin-induced room temperature phosphorimetry, *Spectrochim. Acta A* 56 (2000) 1513–1521.
- [15] M. Valcárcel, M.D.L. de Castro, Flow-through (Bio) Chemical Sensors, Elsevier, The Netherlands, 1994.
- [16] A.F. Gutiérrez, S.G. Shulman (Eds.), Fosforescencia Molecular Analítica: Una Aproximación Práctica, Editorial Universidad de Granada, Granada, 2001.
- [17] J.F.F. Sánchez, A.S. Carretero, C.C. Blanco, A.F. Gutiérrez, Highly sensitive and selective fluorescence optosensor to detect and quantify benzofluoranthrene in water samples, *Anal. Chim. Acta* 506 (2004) 1–7.
- [18] J.F.G. Reyes, E.J.L. Martínez, P.O. Barrales, A.M. Díaz, Multiwavelength fluorescence based optosensor for simultaneous determination of fuberidazole, carbaryl and benomyl, *Talanta* 64 (2004) 742–749.
- [19] J.F.F. Sánchez, A.S. Carretero, C.C. Blanco, A.F. Gutiérrez, A sensitive fluorescence optosensor for analysing propranolol in pharmaceutical preparations and a test for its control in urine in sport, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 31 (2003) 859–865.

- [20] Z.L. Gong, Z.J. Zhang, An optosensor based on the fluorescence of metal complexes adsorbed on Chelex 100, *Anal. Chim. Acta* 325 (1996) 201–204.
- [21] J. Kuijt, F. Ariese, U.A.Th. Brinkman, C. Gooijer, Room temperature phosphorescence in the liquid state as a tool in analytical chemistry, *Anal. Chim. Acta* 488 (2003) 135–171.
- [22] B.C. Díaz, S.C. Terrones, A.S. Carretero, J.M.C. Fernández, A.F. Gutiérrez, Comparison of three phosphorescent methodologies in solution for the analysis of naphazoline in pharmaceutical preparations, *Anal. Bioanal. Chem.* 379 (2004) 30–34.

Biographies

Silvia Casado Terrones was born in Jaén, Spain on 11 August 1979. She received her BSc in Chemistry from the University of Granada, Spain, in 2002. She has joined the “Environmental, Biochemical and Nutritional Analytical Control Research Group (FQM-297)” in the Department of Analytical Chemistry at University of Granada, where she is working on her doctoral thesis. She has been working on the theoretical studies and the development of luminescence methods and on new sensor phases (molecular imprinted polymers, sol-gel technology, polymeric membranes) for designing of portable luminescence sensors.

Jorge F. Fernández Sánchez obtained his BSc Chemical Sciences at University of Granada, Spain, in 1999, and his PhD in Chemical Sciences in 2003. Since 1998, he is joined in the “Environmental, Biochemical

and Nutritional Analytical Control Research Group (FQM-297)” in the Department of Analytical Chemistry at University of Granada. He has been working on the theoretical studies and the development of luminescence methods and on the development of optical sensors for analysing Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, drugs and food compounds. In the actuality, He is working at the Centre for Chemical Sensor (Swiss Federal Institute of Technology in Zurich, Switzerland) as a postdoctoral researcher, where he is involved in the development of fibre optical sensors for determining pollutants in gas atmospheres.

Antonio Segura Carretero obtained his BSc Chemical Sciences at University of Granada (Spain) in 1992 and his PhD in Chemical Sciences in 1996. Since 2001, he is assistant professor at the Department of Analytical Chemistry, University of Granada (Spain) and author of more than 60 articles published in international journals. His research interest are focused on the application of CE with luminescence and mass spectrometry detection and the establishment of chemical luminescence sensors for environmental samples.

Alberto Fernández Gutiérrez is the head of Research Group (FQM 297) belonging to the Department of Analytical Chemistry at the Faculty of Sciences of the University of Granada (Spain). He obtained his BSc in Chemistry in 1969 and his PhD in Analytical Chemistry in 1973. Since 1986, he is professor of analytical chemistry in the cited department. Today, his main research area involves the development of analytical techniques and methodologies in the control of environmental, biochemical and food analysis.

Los principales resultados que se pueden derivar de la investigación descrita en este capítulo se resumen en:

1. Para demostrar la utilidad de los optosensores convencionales en el control de algunos procesos industriales farmacológicos y en el análisis de control de ciertos parámetros ambientales, se han desarrollado cuatro optosensores, dos fluorescentes y dos fosforescentes, para la determinación de un principio activo en dos colirios comerciales y de una fitohormona en suelos. Para ello:

1a. En el caso de los dos *optosensores fluorescentes* se ha realizado un estudio de las características fluorescentes a temperatura ambiente en disolución y en superficie sólida de los dos analitos a estudio.

Se ha establecido el soporte sólido con el que mejor interaccionan haciendo un riguroso estudio con quince resinas comerciales a dos valores de pH, por encima y por debajo de sus pK_{as} correspondientes. En lo que a la NFZ se refiere, el pK_a del grupo imidazol de su molécula es del orden de 7. Como se deduce de esta estructura, la NFZ interacciona con las resinas catiónicas (Sephadex CM, Sephadex SP, Dowex 50wx2, Dowex 50wx4 y Dowex 50wx8) por la capacidad de protonación que presenta el nitrógeno aromático a un pH inferior a su pK_a y con las resinas no iónicas (Amberlita XAD7, Gel Silica Davisil y Gel Silica Merck) al operar a un pH superior a su pK_a . En el caso del β -NOA, el grupo ácido presente en su estructura hace que se produzca interacción con las resinas aniónicas y neutras.

Se ha analizado la influencia que tiene el tamaño de partícula de la fase sensora sobre la respuesta del optosensor tamizando la fase sensora óptima (Amberlita XAD7 en ambos casos) a cuatro intervalos de tamaño diferentes (40-63 μm , 63-80 μm , 80-120 μm , 120-160 μm y >160 μm).

Debido a que la interacción de la NFZ y del β -NOA con la fase sensora es irreversible a las condiciones de trabajo, se ha buscado el sistema de regeneración más efectivo modificando el pH y la constante dieléctrica del medio.

Se han seleccionado los parámetros instrumentales (voltaje del detector, anchura de rendijas de excitación y emisión y resolución del equipo), variables experimentales (influencia de pH del medio, tipo y concentración de disolución reguladora) y variables de flujo del sistema (velocidad de flujo y volumen de muestra inyectada) óptimos para obtener la máxima respuesta del optosensor.

De esta forma se ha desarrollado un optosensor fluorescente para determinar NFZ basado en su interacción con la fase sensora Amberlita XAD7 a pH 8 (fijado con una disolución reguladora glicina/NaOH 10 mM). Las medidas fluorescentes se realizan a 294/326 nm, 750 V y 4 nm de anchura de rendija de excitación y emisión. Como disolución regenerante del sistema se usan 250 μ L de acetona que permiten recuperar la línea base del fiagrama entre inyección e inyección de muestra (2 mL a una velocidad de flujo de 2.5 mL/min). Se obtiene con este optosensor un intervalo lineal de 2.6 a 225 ng/mL, un límite de detección de 2.6 ng/mL y un límite de cuantificación de 8.7 ng/mL. Este optosensor se aplica satisfactoriamente a la determinación de NFZ en dos colirios comerciales (99.2% y 100.1% de porcentaje de recuperación con una desviación estándar relativa del 6.8% y 1.5%, para el Colirio Alfa y Euboral Oftálmico, respectivamente).

De forma similar, se ha puesto a punto un optosensor fluorescente para determinar β -NOA basado en la interacción del analito en Amberlita XAD7 en un medio de glicina/HCl 10 mM a pH 2.5 midiendo la fluorescencia a 328/348 nm, 650 V y 4/4 nm de rendijas. Al igual que para el sistema de la NFZ, 250 μ L de acetona permiten regenerar el sistema sensor (2 mL a una velocidad de flujo de 2.5 mL/min). Se consigue obtener un intervalo lineal de 2 a 225 ng/mL, con un límite de detección de 2 ng/mL y un límite de cuantificación de 6.7 ng/mL. Se consiguen porcentajes de recuperación de 90% con desviaciones estándares relativas de 1.81% cuando se aplica el presente método a muestras de suelos.

En este punto, merece la pena explicar con más detalle el proceso de toma de muestra (en ambos optosensores-fluorescente y fosforescente-para el β -NOA), ya que no se muestra en el correspondiente artículo anteriormente mostrado.

De que la toma de muestra sea adecuada depende, en gran parte, la utilidad del método empleado. Esto se consigue teniendo en cuenta las características del terreno y, a partir de ahí, siguiendo un método normalizado de muestreo. Hay que definir dos conceptos muy utilizados por científicos dedicados al estudio de suelos para expresar un análisis: el peso de *tierra fina*, que se define como el material que pasa a través de un tamiz de 2 mm de malla y el denominado *muestra analítica*, que es la porción de suelo que se utiliza como conjunto de una determinación analítica única. Teniendo en cuenta esto, se tomó 1 kg de muestra de suelo de zona de cultivo (Granada). Esta muestra analítica se deja expuesta al aire dos días, transcurridos los cuales se divide por cuarteo hasta tener una porción de unos 150 g que se tamizan con una malla de 2 mm para obtener la tierra fina y a partir de ésta se toman submuestras de 5 g para realizar los distintos análisis (siete réplicas para tres muestras distintas a dos niveles de concentración).

1b. En el caso de los *optosensores fosforescentes*, la metodología llevada a cabo es muy similar a la empleada en los fluorescentes con algunas diferencias que vienen impuestas por la distinta naturaleza del medio, necesaria para obtener la señal fosforescente de los analitos a estudio. Para obtener señal fosforescente en disolución es imprescindible la presencia de altas concentraciones de átomo pesado para favorecer el acoplamiento spín-orbital y producirse la transición singlete-triplete. Además el oxígeno ha de ser eliminado del sistema puesto que produce una gran atenuación de la emisión fosforescente. Por estos dos motivos, el tipo y la concentración de átomo pesado y la concentración de agente desoxigenante fueron las variables experimentales sujetas a estudio, junto con el pH del medio. Diferencias también se presentan en el estudio de las variables instrumentales necesarias a optimizar: en el caso de la

fosforescencia se requiere estudiar cuál es el efecto del tiempo de demora (t_d , tiempo a partir del cual se integra la señal fosforescente desde el pulso de la lámpara) y del tiempo de integración (t_g , tiempo durante el cual se integra la señal) del equipo sobre la señal fosforescente (Figura 1-3).

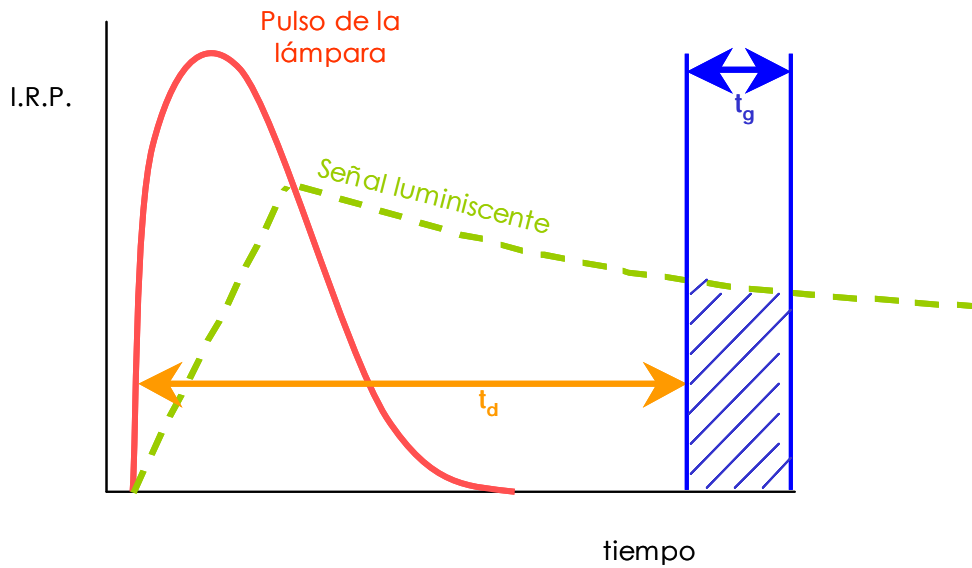


FIGURA 1-3. Definición del tiempo de respuesta (t_d) y de integración (t_g) en el sistema fosforescente

De esta forma, se ha desarrollado un optosensor fosforescente para la determinación de NFZ en colirios comerciales basándose en la interacción del analito en la resina comercial Amberlita XAD7 en un flujo de disolución portadora de 1.6 M KI (Figura 1-4) y 15 mM Na_2SO_3 (Figura 1-5). Este es el primer trabajo que muestra la posibilidad de determinar directamente NFZ con un optosensor sin necesidad de formar agregados.

Como se indicó anteriormente, en el trabajo correspondiente publicado donde se recoge el optosensor fosforescente para la NFZ no hubo cabida para toda la información que se requiere dar al explicar dicho optosensor, de ahí que se muestren en este punto ciertas figuras que son importantes para la valoración global del capítulo.

Se estudiaron diferentes átomos pesados, concretamente se ensayaron diferentes sales alcalinas del grupo de los halógenos y diferentes sales solubles de átomos pesados (KCl, ClRb, KBr, NaI, KI y TINO₃), siendo el KI el que ofrecía mejores resultados.

Tres posibilidades fueron ensayadas: añadir KI sólo en la muestra, añadir KI sólo en la disolución portadora y, en tercer lugar, añadir la misma cantidad de KI en la muestra y en el portador. Tanto desde un punto de vista de la sensibilidad (mayor respuesta del optosensor) como de la reproducibilidad los mejores resultados se obtuvieron cuando había las mismas condiciones en la muestra y en la disolución portadora.

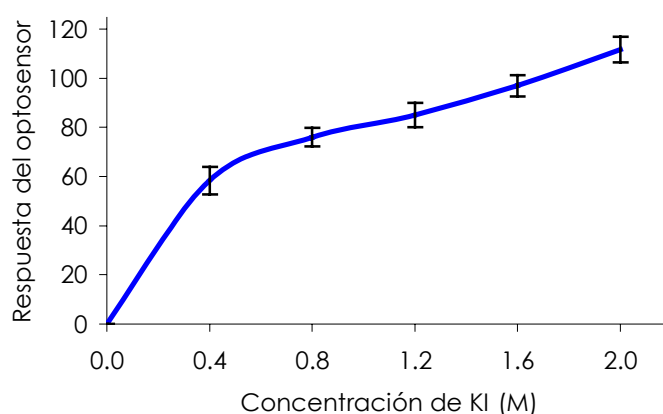
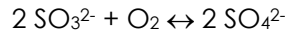


FIGURA 1-4. Influencia de la concentración de KI en la respuesta del optosensor. [NFZ] 300 ng/mL, [Na₂SO₃] 10 mM. $\lambda_{exc/em}$ 290/520 nm, voltaje del detector 850 V, anchura de rendijas 20/20 nm, t_d/t_g 0.12/5 ms. Flujo 2 mL/min, 2 mL de muestra y 1 mL disolución regenerante

En primer lugar destacar que no se obtiene señal fosforescente en ausencia de átomo pesado y que un aumento de la concentración de KI provoca un aumento de la respuesta del optosensor. Se seleccionó una concentración de 1.6 M por dar una señal analítica alta y un error aceptable para el método propuesto.

Extensos estudios previos en nuestro grupo de investigación nos llevaron a la conclusión de que el sulfito sódico era el agente desoxigenante más eficaz en el desarrollo de sensores fosforescentes.

El proceso que permite la eliminación casi instantánea del oxígeno del medio es:



Se estudió la influencia de este agente desoxigenante realizando tres réplicas de cada muestra y variando la concentración de sulfito sódico tanto en la muestra como en la portadora. La figura 1-5 refleja tal influencia, observando en primer lugar, que no se produce emisión fosforescente en ausencia de sulfito sódico. En segundo lugar, se puede ver que un aumento de la concentración de Na_2SO_3 provoca un aumento de la respuesta del optosensor hasta que la concentración es 10 mM, a partir de la cual no varía ni la respuesta del optosensor ni el error de las medidas. Por tanto, para asegurarnos que tanto la muestra como la disolución portadora permanecen desoxigenadas, incluso después de varias horas tras su preparación, se seleccionó una concentración de 15 mM.

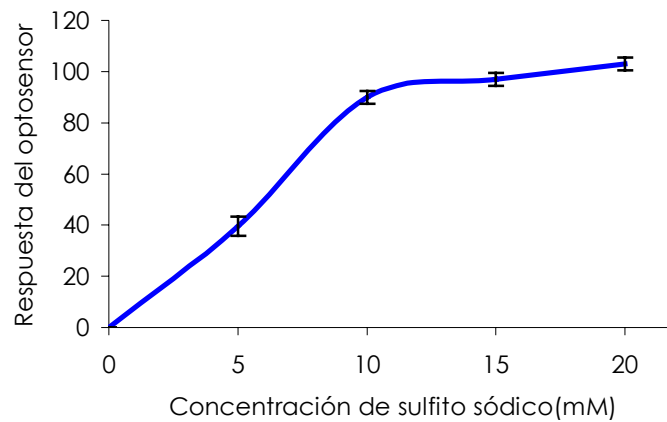
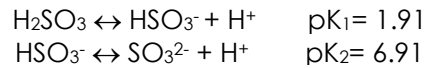


FIGURA 1-5. Influencia de la concentración de Na_2SO_3 en la respuesta del optosensor. [NFZ] 300 ng/mL, [KI] 1.6 M. $\lambda_{\text{exc/em}}$ 290/520 nm, voltaje del detector 850 V, anchura de rendijas 20/20 nm, t_d/t_g 0.12/5 ms. Flujo 2 mL/min, 2 mL de muestra y 1 mL disolución regenerante

El pH del medio afecta a la capacidad del sulfito en la eliminación del oxígeno. Esto se puede ver si se observan los equilibrios de disociación ácido-base del reactivo:



El pH a partir del cual se ha comprobado que la actuación desoxigenante del sulfito es positiva es aproximadamente 6. Además el pH afecta a la interacción de analitos con grupos (des)protonables con la fase sensora. Por esto es una variable experimental de gran importancia.

Experimentalmente se confirma que variando el pH de la muestra y de la disolución portadora con HCl/NaOH desde 4 hasta 11 se descubre que se puede trabajar entre pH 5 y 10 aproximadamente, consiguiéndose la máxima respuesta del optosensor entorno a pH 8 (ver Figura 1-6).

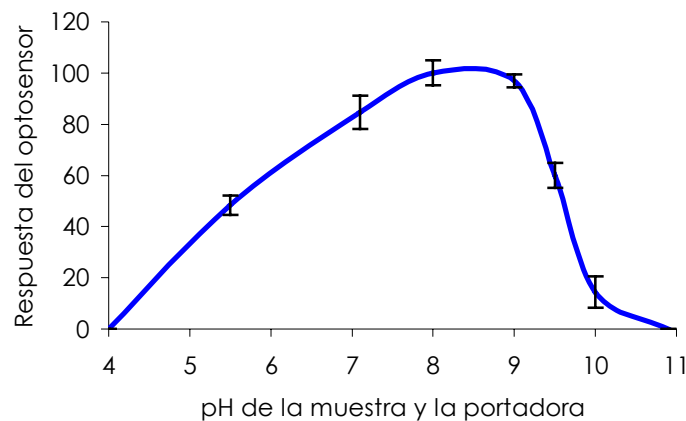


FIGURA 1-6. Influencia del pH en la respuesta del optosensor. [NFZ] 300 ng/mL, [KI] 1.6 M, [Na₂SO₃] 15 mM. $\lambda_{exc/em}$ 290/520 nm, voltaje del detector 850 V, anchura de rendijas 20/20 nm, t_d/t_g 0.12/5 ms. Flujo 2 mL/min, 2 mL de muestra y 1 mL disolución regenerante

El pH del medio está entorno a 9, y viene impuesto por la presencia del átomo pesado y el desoxigenante; como es entorno a este pH donde se obtienen la máxima señal fosforescente no es necesario utilizar ningún sistema de regulación del pH. Un mL de disolución 2 M NaCl con 15% de acetona se usa como regenerante. Se registra la intensidad relativa de

fosforescencia a 290/520 nm, con un voltaje de 850 V, 20/20 nm las rendijas de excitación y emisión y un t_d/t_g de 0.12/5 ms. Se obtiene así con este optosensor un intervalo lineal de 9.4 a 1000 ng/mL, un límite de detección de 9.4 ng/mL y un límite de cuantificación de 31.2 ng/mL. Porcentajes de recuperación de entorno a 97% con una desviación estándar relativa de entorno al 2% se obtienen en las dos aplicaciones.

De forma similar se ha puesto a punto un sistema sensor fosforescente para la determinación de β -NOA en suelos basado en la inmovilización de esta fitohormona en Gel de Silica Merck en un sistema de flujo de 175 mM $TiNO_3$ y 10 mM Na_2SO_3 , con un voltaje de 850 V, 20/20 nm de rendijas y un t_d/t_g de 0.12/5 ms. Se consiguen límites de detección de 4.9 ng/mL y de cuantificación de 16.4 ng/mL. El método se aplica satisfactoriamente en muestras de suelos con un 104.1% de porcentaje de recuperación y un 2.13% de desviación estándar relativa.

2. Se ha llevado a cabo una minuciosa comparación entre optosensores fluorescentes y fosforescentes; también se realiza una visión comparativa con los métodos existentes en bibliografía:

2.a. El método más sensible, rápido, barato y con mayor potencial de miniaturización para determinar NFZ es el fluorescente. Revisando los métodos existentes en bibliografía se encuentra que el método HAI-RTP desarrollado por nuestro grupo de investigación es el que presenta el menor límite de detección.

2.b. En el caso de los optosensores luminiscentes para determinar β -NOA, el fluorescente sigue siendo más sensible que el fosforescente y el que presenta mayor potencial de miniaturización. Si bien el fosforescente es más rápido y la mayor resolución espectral que presenta podría simplificar el desarrollo de los dispositivos ópticos asociados al mismo. Comparando ambos métodos con los existentes en bibliografía, se comprueba que ambos compiten muy favorablemente con el más sensible encontrado, un espectrofluorimétrico que posee 1.2 ng/mL de límite de detección, y

superando con creces los límites de detección obtenidos con HAI-RTP, HPLC, GC, etc.

CAPÍTULO 2

Desarrollo de un optodo para la detección de compuestos orgánicos volátiles

Este capítulo tiene como objetivo desarrollar un optodo para la detección (y cuantificación) de Compuestos Orgánicos Volátiles (VOCs), que pueden llegar a tener aplicación en la industria química o alimentaria, en el desarrollo de narices optoelectrónicas, o en temas de seguridad en ambientes tóxicos. El trabajo experimental ha sido desarrollado en el Departamento de Ingeniería Eléctrica y Electrónica de la Universidad Pública de Navarra (Pamplona).

Por definición, un VOC es aquel compuesto cuya presión de vapor a 20 °C es inferior a 760 torr (101.3 kPa) y superior a 1 torr (0.13 kPa). Los VOCs se usan comúnmente como ingredientes en muchos productos de limpieza del hogar, o en procesos industriales donde se evaporan a temperatura ambiente y pueden ser respirados, y desafortunadamente, pueden tener efectos nocivos sobre la salud. Compuestos sintéticos, como pinturas y ceras, o los combustibles, liberan vapores tóxicos durante su almacenamiento. Incluso alimentos y bebidas emiten vapores orgánicos⁸⁴. Especialmente importante es el control de estos VOCs en la industria química donde es necesario tener bajo control las emisiones para salvaguardar la salud de los trabajadores y evitar ambientes dañinos.

Los sensores de fibra óptica son una alternativa muy atractiva para la detección de VOCs⁸⁵ por su inmunidad electromagnética, superando así las dificultades que presentan los sensores electrónicos. Además, los sensores de fibra óptica son compactos, mínimamente invasivos, lo que hacen que sean también idóneos para medir gases disueltos en líquidos o en fluidos corporales. Otra ventaja es la posibilidad de medir *on-line*, opción muy interesante en cualquier tipo de aplicación. Cuando se emplean sistemas de fibra óptica, es posible transmitir señales ópticas a grandes distancias, lo que permite realizar análisis en ambientes peligrosos (en ambientes

⁸⁴ Semmerloch P., Grosh W., *Studies on character impact odorants of coffee brews*, J. Agr. Food Chem. 44, 537 (1996).

⁸⁵ Elosúa C., Matías I.R., Barriáin C., Arregui F.J., *Volatile organic compound optical fiber sensors: a review*, Sensors 6, 1440 (2006).

radiactivos, en atmósferas contaminadas, a altas temperaturas o presiones, etc.) sin necesidad de recurrir previamente a la realización de la toma de muestra.

Todo esto ha hecho que desde que se inició la detección de VOCs con sensores de fibra óptica hace unos 25 años⁸⁶, haya habido un gran esfuerzo en seguir investigando para mejorar esta tecnología.

El optodo que se ha desarrollado en este capítulo se basa en la modificación de un parámetro característico de la fibra óptica: su índice de refracción. Esto se realiza depositando en un extremo de la misma una fase sensora que modifica sus propiedades ópticas (absorbancia) cuando interacciona con los VOCs a estudio. Por lo tanto, el sensor consistirá en una fuente de luz conectada a una fibra óptica que transmite la radiación a otro punto en el que se mide la potencia óptica recibida. Durante ese trayecto, en algún punto intermedio el parámetro a medir interactúa con la fase sensora, produciéndose la modulación de la señal óptica, lo que da lugar a un cambio en la señal óptica recibida del sensor.

Existen varias formas de modificar un parámetro fundamental de la fibra óptica como es el índice de refracción. Una de ellas queda reflejada en la configuración en reflexión, donde se consigue modificar el índice de refracción de las capas depositadas directamente sobre la punta de la fibra óptica, y la otra configuración es en transmisión, donde se puede acceder al campo evanescente a través de distintos métodos, como la sustitución de la cubierta por un material sensible, o el estrechamiento de la fibra óptica (*taper*). Existe además una tercera forma, basada en el campo evanescente pero en configuración en reflexión, llamada híbrida reflexión-transmisión.

En este capítulo se muestran los resultados obtenidos tras desarrollar un optodo en configuración reflexión para la determinación y cuantificación

⁸⁶ Giuliani J.F., Wohltjen H., Jarvis N.L., *Reversible optical waveguide sensor for ammonia vapors*, Opt. Lett. 8, 54 (1983).

de vapores de etanol, metanol y ácido acético, plasmados en el artículo ***Volatile-organic-compound optic fiber sensor using a gold-silver vapochromic complex***, publicado en *Optical Engineering*, 45, 044401 (2006).

Además, y después del trabajo, se planteará otra posible configuración (en transmisión) para desarrollar optodos de fibra óptica, mostrándose sus ventajas e inconvenientes.

Volatile-organic-compound optic fiber sensor using a gold-silver vapo-chromic complex

Silvia Casado Terrones

University of Granada
Department of Analytical Chemistry
Faculty of Sciences
Campus Fuentenueva s/n
18071 Granada, Spain

César Elosúa Aguado

Cándido Bariáin

Public University of Navarra
Department of Electric and Electronic
Engineering
Campus de Arrosadia s/n
31006 Pamplona, Spain

Antonio Segura Carretero

University of Granada
Department of Analytical Chemistry
Faculty of Sciences
Campus Fuentenueva s/n
18071 Granada, Spain
E-mail: ansegura@ugr.es

I. R. Matías Maestro

Public University of Navarra
Department of Electric and Electronic
Engineering
Campus de Arrosadia s/n
31006 Pamplona, Spain

Alberto Fernández Gutiérrez

University of Granada
Department of Analytical Chemistry
Faculty of Sciences
Campus Fuentenueva s/n
18071 Granada, Spain

Asunción Luquin

Julián Garrido

Public University of Navarra
Department of Applied Chemistry
Campus de Arrosadia s/n
31006 Pamplona, Spain

Mariano Laguna

University of Zaragoza
Institute of Materials Science of Aragón CSIC
Department of Inorganic Chemistry
Campus San Francisco s/n
50009 Zaragoza, Spain

Abstract. We describe a new gold-silver complex based on 2,2'-bipyridine, whose formula is $\{Au_2Ag_2(C_6F_5)_4[(C_5H_4N)-(C_5H_4N)]_2\}_n$, used to detect volatile organic compounds (VOCs) such as ethanol, methanol, and acetic acid. This organometallic material is presented in the form of bright yellow powder, and suffers a change in its optical properties when it is exposed to VOCs. A new fiber optic sensor is presented based on the properties of a new vapo-chromic material. The sensor works in a reflection configuration and consists of an optic fiber pigtail (core diameter is 200 μm and cladding is 230 μm) on the cleaved end of which the vapo-chromic material, previously mixed with a commercially available solvent, Liquicoat[®], is deposited by using the dip-coating technique. Using an optical source and a photodetector, it is possible to detect and quantify the change in reflected intensity-modulated signal when the sensor is exposed to VOC inside a sealed chamber. This behavior can be related to the VOC concentration. The study of the sensor's response is made at a specific wavelength for different VOC concentrations. Limits of detection of 2.16, 1.73, and 3.73 mg/L of vapors of ethanol, methanol, and acetic acid vapors, respectively, are attained.

© 2006 Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers. [DOI: 10.1117/1.2192470]

Subject terms: optic fiber sensor; gold-silver vapo-chromic material; dip-coating technique.

Paper 050345R received Apr. 29, 2005; revised manuscript received Jul. 28, 2005; accepted for publication Sep. 5, 2005; published online Apr. 27, 2006.

1 Introduction

In the last few years, investigation of sensors for volatile organic compound (VOC) detection has increased greatly, motivated by the number of applications where they can be used, such as food or chemical industry, electronic noses, or safety concerning toxic ambient conditions. So far, the devices developed are polymer-based electronics. Although

this technology has been improved in the last few decades, it presents some important limitations. Because these devices are electronic, they cannot be used in electromagnetic noisy places. Also, they show a great dependence on ambient conditions, mainly temperature. Some devices must be heated to 400°C just to operate, which implies a great waste in energy and poor mobility.

Fiber optic sensors have many characteristics that give them an advantage over conventional ones. They are compact and lightweight, in general are minimally invasive,

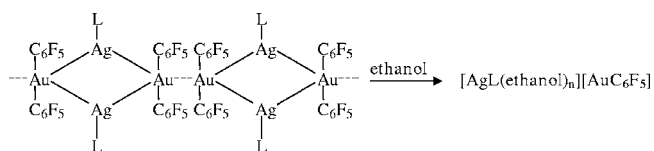


Fig. 1 Molecular structure of the new developed vapochromic material and its reaction in the presence of ethanol vapors.

immune to electromagnetic interference, can be multiplexed effectively on a single fiber network, etc. The main advantage of fiber optic sensors is tackling difficult measurement situations where conventional sensors are not well suited for use in a particular environment. Actually, many sensors have already been developed. Some are based on Fabry-Perot interferometers,¹⁻³ other sensors are obtained by depositing a material either in the core of an optical fiber⁴⁻⁷ or onto the thinnest zone of a biconically tapered optic fiber.^{8,9} There are also sensors based on the reflection of films deposited at the end of a fiber optic pigtail.^{10,11} The main working principle of fiber optic sensors is the modulation of guided light caused by the sensing material.

In this work, a new vapochromic material whose optical properties (such as color, and therefore, refraction index) change in the presence of VOC (ethanol, methanol, acetic acid, etc...), has been fixed to the end of a cleaved fiber pigtail to perform a VOCs detector sensor.

2 Materials and Instrumentation

The phenomenon of vapochromism (shifts in absorption and emission maxima characteristic for specific organic solvents¹²) has been studied since Nagel¹³ first synthesized Pd and Pt mixed salts as gases and vapor detectors. These salts have been used in the detection of volatile organic compounds (VOCs) with optical fiber sensors.^{14,15} Gold complexes¹⁶ and bis(phthalocyaninate) rare-earth compounds are also applied in the sensor field due to their vapochromic characteristics.

In previous research, we found some gold complexes with vapochromic characteristics.¹⁷⁻¹⁹ We present a new vapochromic polynuclear silver-gold complex to detect and quantify VOCs such as ethanol, methanol, and acetic acid. This compound, of molecular formula $\{Au_2Ag_2(C_6F_5)_4[(C_5H_4N)-(C_5H_4N)]_2\}_n$, changes its color (and therefore its refractive index) from bright yellow to red when it is exposed to organic solvent vapors.

Figure 1 shows the molecular structure of the sensing material synthesized in our laboratories. The mechanism, which occurs when the VOC is in contact with the vapochromic material, is well known: the polynuclear structure disappears due to the break down of first the gold-gold contacts and then the gold-silver bonds, and the solvent is coordinated with the silver center. The new anion-cation derivative formed, $\{Ag[(C_5H_4N)-(C_5H_4N)](VOC)_n\} \times [Au(C_6F_5)_2]$, has a different refractive index compared to the first one, allowing the parameters to define the reflectance changes while the VOC molecules are in contact with the vapochromic material. This organometallic complex

120

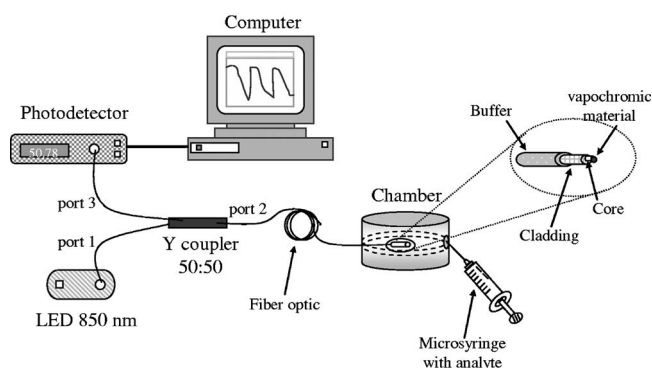


Fig. 2 Experimental setup implemented to characterize the sensor's behavior.

needs a big quantity of solvent to show a color change, although a small quantity of solvent is able to induce detectable changes in the refractive index.

It was necessary to fix the vapochromic material into the cleaved end of the fiber and Liquicoat[®] was chosen, a commercially available solvent, purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA) and used as supplied. This product is a metal alkoxide colloidal solution containing 7% silica and is normally used for the deposition of antireflective coatings on displays, but it has been used to detect chemical parameters in fiber optic sensors²⁰ and to fabricate optical waveguides.^{21,22}

The sensor is made up of a plastic cladding-silica core (PCS) multimode optic fiber pigtail (core and plastic cladding diameters 200 and 230 μ m, respectively), the end of which is cut with a Siemens S46999-M9-A8 precision fiber cleaver. The principal advantage of this fiber is the ease of removing its plastic cladding. As the optical source, it is not necessary to use a laser but a LED, so the sensor system could be fabricated at a lower cost. The core's fiber width ensures a high numeric aperture, making easy coupling light into the fiber.

The experimental setup to measure the reflected optical power is shown in Fig. 2. A Y coupler 50:50 was used to connect the system. This device has also a 200- μ m core diameter to avoid insertion losses. The sensor head is con-

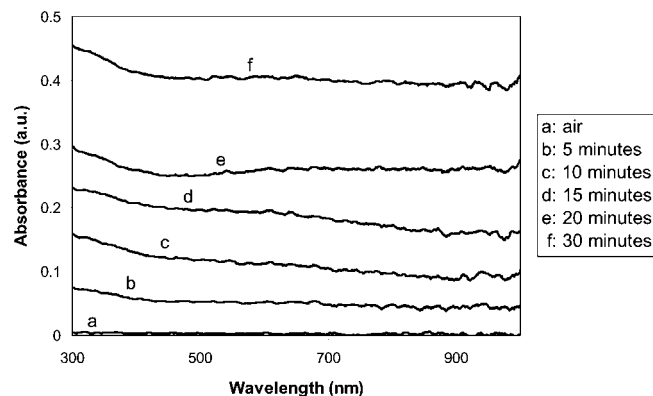


Fig. 3 Absorbance spectrum of vapochromic material when it is exposure to 1 ml of methanol after 0 (outside in air), 5-, 10-, 15-, 20-, 25-, and 30-min exposure.

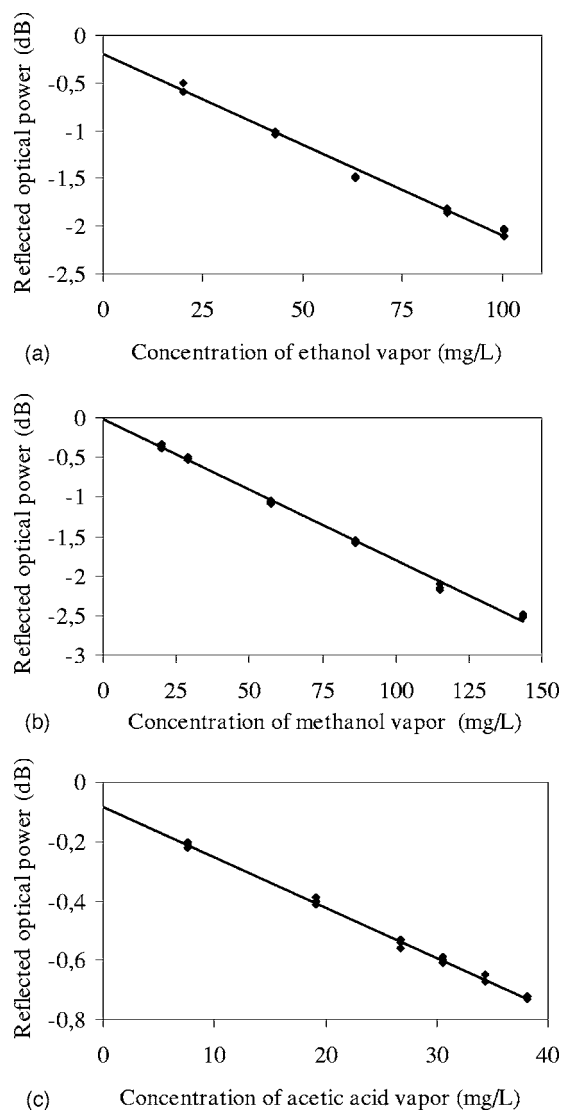


Fig. 4 Sensor's response with different VOC concentrations at 850 nm: (a) ethanol, (b) methanol, and (c) acetic acid.

nected to port 2 and introduced into the chamber (9 cm diam and 2 cm high, 275 cm³ volume), and closed hermetically. The other two ports are connected to the LED source (port 1) and to the photodetector, 675RE from RI-FOCS Corporation (Camarillo, CA, USA) (port 3).

3 Experimental Results and Discussion

To produce VOC sensitive films, different coatings based on Liquicoat[®] solution and vapo-chromic material were deposited on microscopic glass slides, varying the volume ratio of Liquicoat[®] and vapo-chromic material. The coatings were made using a concentration of 1 mg of vapo-chromic material per 10 μ L of Liquicoat[®], after several experimental attempts with different ratios. This ratio was the optimum for obtaining coatings without cracks and with enough vapo-chromic material for a proper optical response.

Ten films were deposited at the end of the fiber using the dip-coating technique. This technique has to be carried out with great precision, therefore a mobile platform is used at 1-cm/s velocity, obtaining coatings with a uniform profile

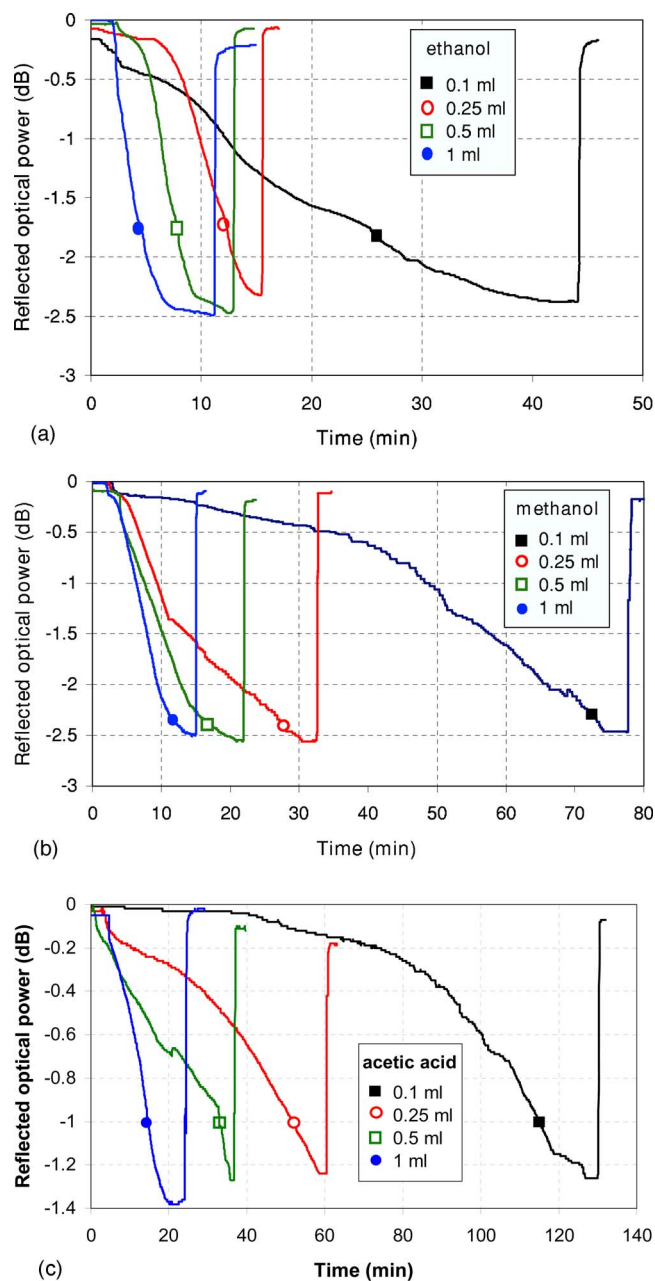


Fig. 5 Behavior of the sensor versus different volumes of the three VOCs when the atmosphere is saturated with vapor: 1, 0.5, 0.25, and 0.1 ml of (a) ethanol, (b) methanol, and (c) acetic acid.

and yielding to an acceptable reproducibility. The solvent needs one day to evaporate; after that, the vapo-chromic complex stays perfectly adhered to the end of the fiber.

3.1 Absorbance Spectra Analysis

The absorbance spectra analysis is carried out using the same reflection setup shown in Fig. 2, but with a white light source connected to port 1 and a CCD spectrometer, PC2000 connected to port 3, instead of a LED and a photodetector, respectively. The absorbance is shown in absorbance units, defining it as:

Table 1 Analytical performance characteristics for the method when the atmosphere is not saturated with vapor. S_0 is the standard deviation of the blank, and RSD is the relative standard deviation for an intermediate point of the calibration curve.

<i>Nonsaturation situation</i>	Ethanol	Methanol	Acetic acid
Slope	0.0191	0.0178	0.0170
Intercept	0.1944	0.0241	0.081
Correlation coefficient	0.9945	0.9980	0.9913
Linear range (mg/l)	2.16 to 100.50	1.73 to 143.60	3.73 to 38.20
s_0	0.013	0.011	0.023
Detection limit (mg/l)	2.16	1.73	3.73
Quantification limit (mg/l)	7.18	5.76	12.44
RSD %	0.671	1.437	1.741

$$A = \frac{S_\lambda - D_\lambda}{R_\lambda - D_\lambda},$$

where S_λ is the optical power received from the sample, D_λ is the optical power of the dark reference signal, and R_λ is the optical power monitored from the reference signal, all of them at wavelength of λ .

An absorbance spectra analysis was carried out to check whether or not the material used is sensitive to VOCs. Figure 3 shows the wide spectral region where the optical signal changes. The absorbance spectrums are almost flat from 400 nm, and exhibit a smooth curve in the 300 to 400-nm band. This means that there is a change in the refractive index, but no remarkable color change is achieved (remember that a big quantity of solvent is required to achieve this). This gives the system an important degree of flexibility and the possibility of fabricating different sensors at distinct working wavelengths and implementing a sensor network using, for example, a wavelength division multiplexing scheme in a straightforward way.

3.2 Reflected Optical Power Analysis

Although the results presented here are obtained with a 850-nm LED source, it is necessary to comment that other optical sources have also been tested with different coherent lengths and at different working wavelengths. The higher changes were obtained using a simple LED source at 850 nm, and the absorbance spectra shows that there is an optimal detectable change in absorbance at this wavelength. Therefore, all the results presented here are referred to this source.

Using the setup of Fig. 2, when ethanol, methanol, or acetic acid liquid are introduced into the chamber and the vaporization starts, the optical power decreases until it reaches a stable value. Once the chamber opens, the vapors quickly vanish and the reflected optical power returns to its initial values.

The variation in reflected optical power is bigger with greater volumes of VOC introduced, until the atmosphere inside the chamber is saturated with vapor. Then, this variation remains constant, although greater volumes of VOC

were introduced. On one hand, when there was no saturation inside the chamber, it was possible to detect and quantify different concentrations of ethanol, methanol, and acetic acid vapors. On the other hand, when there was saturation vapor inside the chamber, it was possible to relate the fall slopes of the reflected optical power obtained at the photodetector with the evaporation speed of the liquid, and with the volume of liquid introduced.

Therefore, the experimental work has been divided into two sections: one in a nonsaturated situation, and the other with saturation. In the first section it is demonstrated that it is possible to detect and quantify different concentrations of ethanol, methanol, and acetic acid vapors. In the saturation situation, only different liquid volumes, not vapor concentration, are determined because the vapor concentration will always be the same inside the chamber.

It is also shown that the sensor's response time is between 20 to 30 min, which is slower than the results obtained with other vapochromic complexes. The solvent employed to fix the vapochromic material to the end-cleaved fiber, is shown to be transparent to chemical agents once it is dried,²⁰ so time response is an intrinsic characteristic of the vapochromic complex.

3.2.1 Measurements in nonsaturation situation

Taking into account the vapor pressure of the liquids (43.51-, 92.5-, and 12-mm Hg for ethanol, methanol, and acetic acid, respectively), the volume of the chamber (275 cm³), and the temperature (20°C), it is possible to calculate the minimum liquid volume, which produces saturation of the chamber atmosphere: 38.2 μ L for ethanol, 56.4 μ L for methanol, and 10.3 μ L for acetic acid. By introducing lower volumes of VOCs than these values, different vapor concentrations are determined and quantified.

To evaluate this methodology, standard linear calibration graphs were done (see Fig. 4). The measurements were repeated three times to determine error. Analytical performance characteristics were evaluated using the International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) method²³ and are summarized in Table 1.

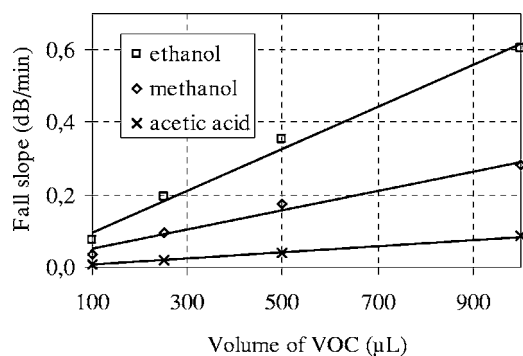


Fig. 6 Fall slopes of the sensor's response when exposed at different volumes of methanol, ethanol, and acetic acid.

3.2.2 Measurements in saturation situation

If greater volumes than the previously mentioned values are introduced into the chamber, the optical power decrease is the same, but the fall slopes of the output reflected optical power will be different, as shown in Fig. 5. In that way, a saturation situation inside the chamber has been reached and the vapor concentration is the same. It is easy to understand from these experimental graphics that greater volumes of VOC introduced into the chamber produce bigger fall slopes in the sensor response.

These slopes let us distinguish between the different VOCs studied due to their different kinetics, as can be inferred from Fig. 6, where the fall slopes of the optical sensor response at different volatile organic compound volumes are presented. As can be seen, the response time of the optical fiber sensor to ethanol, methanol, and acetic acid is clearly different. This fact, with the help of appropriated software, could be further taken into consideration for distinguishing between different VOCs, and could be useful in optoelectronic noses, just to mention an example.

Standard linear calibration graphs were drawn and all the features are summarized in Table 2.

3.2.3 Influence of environmental conditions

How the changes in temperature and humidity can influence the sensor response has been studied by means of a climatic chamber. This setup is similar to Fig. 2 but introduces the sensor head inside the climatic chamber. Here, the conditions of humidity and temperature are changed using a computer, where three cycles of four hours each have been programmed. Within each cycle, the temperature has stayed constant, at 20, 40, and 60°C, respectively, and the humidity has been varied from 15 to 85%, returning to 15% and beginning a new cycle with another temperature. The results show that there are no significant influences of these two variables in the sensor response, as the reflected optical power changes less than 0.1 dB when the temperature and humidity are varied in the range studied.

4 Conclusions

A low-cost volatile-organic-compound fiber-optic sensor is developed. The sensor can detect low concentrations of vapors of ethanol, methanol, and acetic acid. Its low cost, easy implementation, and the possibility of multiplexing into either a telecommunication or a sensor network make

Table 2 Analytical performance characteristics for the method when the atmosphere is saturated with vapor. S_0 is the standard deviation of the blank, and RSD is the relative standard deviation for an intermediate point of the calibration curve.

Saturation situation	Ethanol	Methanol	Acetic acid
Slope	0.0006	0.0003	9×10^{-5}
Intercept	0.0383	0.0238	0.0009
Correlation coefficient	0.9957	0.9908	0.9981
Linear range (μ l)	68.61 to 1000	54.99 to 1000	118.79 to 1000
s_0	0.014	0.011	0.023
Detection limit (μ l)	68.61	54.99	118.79
Quantification limit (μ l)	228.69	183.30	395.96
RSD %	1.762	1.583	1.952

this sensor suitable for use in environmental applications, optoelectronic noses, or chemical industries.

It is important to emphasise that the sensor has been used continuously in the laboratory for more than three months and neither degradation in the material or variation in its behavior has been observed.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the financial support of the FPU Grant of the Ministry of Education, Culture and Sport (reference AP2002-1033), Projects MAT 2003-09074-C02-01, CICYT TIC2003-00909, and BQU2002-04090-C02-02 of the Ministry of Science and Technology, and to Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía and Gobierno de Navarra.

References

1. F. J. Arregui, Y. Liu, I. R. Matías, and R. O. Claus, "Optical fiber humidity sensor using a nano Fabry-Perot cavity formed by the ionic self-assembly method," *Sens. Actuators B* **59**(1), 54–59 (1999).
2. F. J. Arregui, K. L. Cooper, Y. Liu, I. R. Matías, and R. O. Claus, "Optical fiber humidity sensor with a fast response time using the ionic self-assembly method," *IEICE Trans. Electron.* **E83-C**(3), 360–365 (2000).
3. G. Z. Xiao, A. Adnet, Z. Y. Zhang, Z. G. Lu, and C. P. Grover, "Fiber-optic Fabry-Perot interferometric gas-pressure sensors embedded in pressure fittings," *Microwave Opt. Technol. Lett.* **42**(6), 486–489 (2004).
4. B. D. Mac Craith, G. O'Keefe, C. Mc Donagh, and A. K. Mc Evoy, "LED-based fiber optic oxygen sensor using sol-gel coating," *Electron. Lett.* **30**(11), 888–889 (1994).
5. V. Matejec, D. Berkova, M. Chomat, and G. Kuncova, "Modification of the sensitivity and selectivity of thin porous layers coated by the sol-gel method on silica optical fibers to gases," *Proc. SPIE* **4016**, 112–117 (1999).
6. S. Okazaki, H. Nakagawa, S. Asakura, Y. Tomiuchi, N. Tsuji, H. Murayama, and M. Washiya, "Sensing characteristics of an optical fiber sensor for hydrogen leak," *Sens. Actuators B* **93**(1–3), 142–147 (2003).
7. S. Q. Tao, C. B. Winstead, and R. Jindal, "Optical-fiber sensor using tailored porous sol-gel fiber core," *IEEE Sens. J.* **4**(3), 322–328 (2004).

8. C. Bariáin, I. R. Matías, F. J. Arregui, and M. López-Amo, "Experimental results towards development of humidity sensors by using hygroscopic material on biconically tapered optical fiber," *Proc. SPIE* **3555**, 95–105 (1998).
9. C. Bariáin, I. R. Matías, F. J. Arregui, and M. López-Amo, "Optical fiber humidity sensor based on a tapered fiber coated with agarose gel," *Sens. Actuators B* **69**, 127–131 (2000).
10. C. Bariáin, I. R. Matías, I. Romeo, J. Garrido, and M. Laguna, "Behavioral experimental studies of a novel vapochromic material towards development of optical fiber organic compounds sensor," *Sens. Actuators B* **76**, 25–31 (2001).
11. C. Bariáin, I. R. Matías, C. Fernández-Valdivielso, F. J. Arregui, M. L. Rodríguez-Méndez, and J. A. de Saja, "Optical fiber sensor based on lutetium bisphthalocyanine for the detection of gases using standard telecommunication wavelengths," *Sens. Actuators B* **93**, 153–158 (2003).
12. M. A. Mansour, W. B. Connick, R. J. Lachicotte, H. J. Gysling, and R. Eisenberg, "Linear chain Au(I) dimer compounds as environmental sensors: a luminescent switch for the detection of the volatile organic compounds," *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 1329–1330 (1998).
13. C. C. Nagel, "Preparation of vapochromic double complex salts," European Patent Application EP 277003 (1988).
14. C. L. Exstrom, J. R. Sowa, C. A. Daws, D. Janzen, K. R. Mann, G. A. Moore, and F. F. Stewart, "Inclusion of organic vapors by crystalline solvatochromic [Pt(arylonitrile)₄][Pd(CN)₄] compounds: vapochromic environmental sensors," *Chem. Mater.* **7**(1), 15–17 (1995).
15. C. A. Daws, C. L. Exstrom, J. R. Sowa, and K. R. Mann, "Vapochromic compounds as environmental sensors. 2. Synthesis and near-infrared and infrared spectroscopy studies of [Pt(arylonitrile)₄] × [Pt(CN)₄] upon exposure to volatile organic compounds vapors," *Chem. Mater.* **9**(1), 363–368 (1997).
16. C. Bariáin, I. R. Matías, I. Romeo, J. Garrido, and M. Laguna, "Detection of volatile organic compound vapors by using a vapochromic material on a tapered optical fiber," *Appl. Phys. Lett.* **77**(15), 2274–2276 (2000).
17. R. Uson, A. Laguna, M. Laguna, P. G. Jones, and J. M. Sheldrick, "Synthesis and reactivity of bimetallic Au–Ag complexes. X-ray structure of a chain polymer containing the moiety ... (F₅C₆)₂Au(MU–AgSC₄H₈)₂Au(C₆F₅)₂," *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **21**, 1097–1098 (1981).
18. R. Uson, A. Laguna, M. Laguna, B. R. Manzano, P. G. Jones, and J. M. Sheldrick, "Synthesis and reactivity of bimetallic Au–Ag polyfluorophenyl complexes—crystal and molecular structures of [AuAg(C₆F₅)₂(SC₄H₈)_n]_n and [AuAg(C₆F₅)₂(C₆H₆)_n]_n," *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **2**, 285–292 (1984).
19. R. Uson, A. Laguna, M. Laguna, B. R. Manzano, and A. Tapia, "Bimetallic gold-silver pentachlorophenyl complexes," *Inorg. Chim. Acta* **101**(3), 151–153 (1985).
20. F. J. Arregui, M. Otano, C. Fernández-Valdivielso, and I. R. Matías, "An experimental study about the utilization of Liquicoat[®] solutions for the fabrication of pH optical fiber sensor," *Sens. Actuators B* **87**(2), 289–295 (2002).
21. P. N. Shen, S. I. Najafi, and J. F. Currie, "SiO₂ spin-on glass deposited on Si, GaAs, and InP," *Can. J. Phys.* **69**(3,4), 527–529 (1991).
22. M. Bahtat, J. Mugnier, C. Bovier, H. Roux, and J. Serughetti, "Waveguide Raman-spectroscopy of TiO₂/SiO₂ thin-films," *J. Non-Cryst. Solids* **147**, 123–126 (1992).
23. IUPAC. "Nomenclature, symbols, units and their usage in spectrochemical analysis-II. Data interpretation," 33B, 242–248 (1978).



Silvia Casado Terrones received her BSc in chemistry from the University of Granada, Spain, in 2002. She has joined the Environmental, Biochemical and Nutritional Analytical Control Research Group (FQM-297) in the Department of Analytical Chemistry at University of Granada, where she is working on her doctoral thesis. She has been working on the theoretical studies and the development of luminescence methods, and on new sensor phases (molecular imprinted polymers, sol-gel technology, polymeric membranes) for designing portable luminescence sensors.

124



César Elosúa Aguado received his MS degree in electrical and electronic engineering from the Public University of Navarra (UPNA), Pamplona, Spain, in 2004. In the same year, he obtained a scholarship from the Science and Technology Spanish Ministry and he joined the optical fiber sensor group at the Department of Electrical and Electronic Engineering of the UPNA. His research interests include fiber optic sensors.



Cándido Bariáin received his MS degree in telecommunication from the Polytechnic University of Madrid (UPM), Spain, in 1990. He received his PhD degree in Communications from the Public University of Navarra (UPNA), Pamplona, Spain, in 2002. He is currently in the Department of Electrical and Electronic Engineering at the Public University of Navarra. His research interests include fiber optic sensors and optical networks.



Antonio Segura Carretero obtained his BSc in chemical sciences from the University of Granada (Spain) in 1992, and his PhD in chemical sciences in 1996. Since 2001, he has been an assistant professor at the Department of Analytical Chemistry, University of Granada (Spain). His research interest is focused on the application of capillary electrophoresis with luminescence detection, and the establishment of chemical luminescence sensors for environmental

samples.



I. R. Matías Maestro received his MS degree in telecommunications from the Polytechnic University of Madrid (UPM), Spain, in 1992. He was involved in a coherent optical communications research project from 1990 to 1992 in the Alcatel SESA Research Centre in Madrid. In 1993, he joined the optical fiber group in the photonics technology department of UPM, where he received his PhD degree in electrical engineering in 1996. During 1992 and 1993, he was a visiting student at Heriott-Watt University (Scotland) and at Virginia Technical University (Blacksburg, Virginia), respectively. Now he is an associate professor in the electrical and electronic department in the Public University of Navarra (Pamplona, Spain). Recently, he became a member of AENOR and CENELEC 205 working group. His research interests are in the areas of optical fiber sensors, passive optical devices, and optical networks for smart structures and intelligent buildings.



Alberto Fernández Gutiérrez is the head of research group (FQM 297) belonging to the Department of Analytical Chemistry at the Faculty of Sciences of the University of Granada (Spain). He obtained his BSc in chemistry in 1969 and his PhD in analytical chemistry in 1973. Since 1986, he has been a professor of analytical chemistry in the cited department. Today, his main research area involves the development of analytical techniques and methodologies in the control of environmental, biochemical, and food analysis.



Asunción Luquin received her BSc in chemistry from the University of Zaragoza, Spain, in 2000. She joined the inorganic chemistry department at University of Zaragoza and the applied chemistry department at the Public University of Navarra (UPNA), Pamplona, Spain, where she received her PhD degree in chemistry in 2004. Her research interests include synthesis of organometallic and coordination compounds as inorganic materials.



Julián Garrido received his BSc in chemistry from the University of Granada, Spain, in 1977. He was involved in a research project related to adsorption, characterization of porosity and, recently, in synthesis of organometallic compounds. He joined active carbon in the inorganic chemistry department in University of Alicante (Spain), where he received his PhD degree in chemistry in 1984 (under Rodríguez-Reinoso's supervision). During 1984 until 1989, he

was in the engineering school at the University of Navarra (San

Sebastián, Spain). Since 1989, he has been a senior lecturer in the Department of Applied Chemistry in Public University of Navarra (Pamplona, Spain).

Mariano Laguna was awarded the BSc in chemistry (1971) and his PhD (1974) by the University of Zaragoza. His doctoral research (under Uson's supervision) concerned manganese (III, IV) derivatives, which are involved in the active center of photosynthesis. He held a one-year postdoctoral position at Bristol University in Stone's group working in a carbene and carbyne project. In 1979 he returned to Zaragoza University and became a lecturer in inorganic chemistry. He accepted a senior researcher position at the CSIC in 1987, and in 1990 he was promoted to research professor. He is currently the head of the Department of Organometallic Complexes. He is the author of more than 150 papers related to organometallic and coordination properties of several transition metals, mainly coinage 11 metals group. He has been a visiting professor at several foreign universities. His current interests are polyfunctional thiolate complexes and the study of their potential properties as electrical conductors, luminescent behavior, and VOC recognition.

El optodo desarrollado en este capítulo se basa en una configuración en reflexión, si bien, como se introdujo en este capítulo, otras configuraciones son posibles en este tipo de sensores. Una de ellas es la **configuración en transmisión**. Creemos que es interesante mostrar sus principales características y dejar esta opción abierta como posible opción para completar el presente Capítulo en un futuro.

En este tipo de sensor (Figuras 2-1 y 2-2), se sustituye la cubierta de la fibra por la deposición de la fase sensora (compuesto vapocrómico disuelto en Liquicoat®). En esta configuración lo que se consigue es variar el campo evanescente que circula por la cubierta de la fibra.

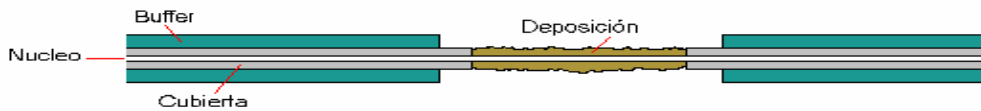


FIGURA 2-1. Estructura de un sensor en transmisión

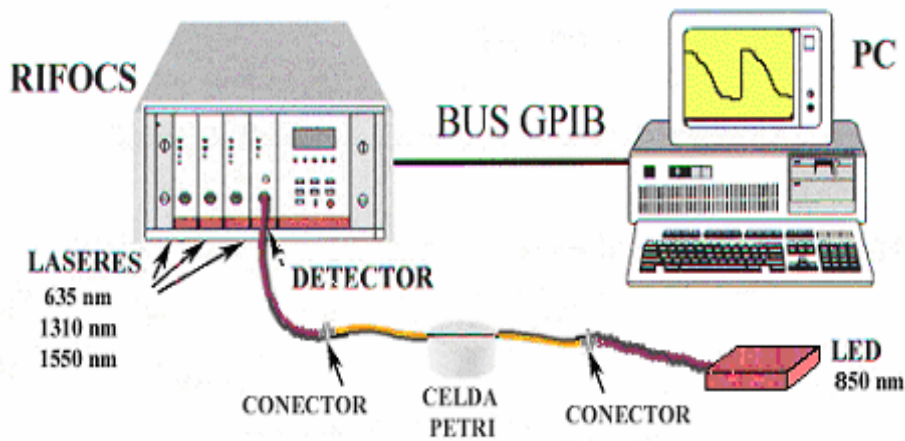


FIGURA 2-2. Montaje instrumental para el optodo en transmisión

En este caso, la deposición del material sensible a los VOCs sobre la fibra óptica es mucho más manual que en el caso de la configuración en reflexión (en ésta se llevaba a cabo con una plataforma móvil que se mueve a una velocidad controlada). Aquí se usa una jeringa para depositar capas del material sensible sobre el núcleo de la fibra, y girando poco a poco la fibra, se vuelven a hacer más deposiciones para que toda la superficie de la misma contenga fase sensora. Claramente, la reproducibilidad en estos optodos será mucho menor que en los de reflexión.

Se podría por lo tanto afirmar que desde el punto de vista de la sencillez y rapidez en la fabricación de los optodos y en la reproducibilidad de las medidas, el de reflexión consigue mejores características.

En cuanto a los montajes se refiere, el optodo en transmisión ofrece la máxima potencia recibida porque su montaje minimiza las pérdidas al viajar la luz directamente desde la fuente hasta el receptor, siendo modificada por el camino sólo la componente del campo evanescente. En este caso, la mayor parte de la luz llega intacta. Sin embargo, en el sensor en reflexión se requiere un montaje más complejo; se usa un acoplador 50:50 que introduce pérdidas. Además, se usa la reflexión de la luz en la punta del sensor y aunque el corte realizado en la punta fuese perfecto, una cantidad de luz se refracta perdiéndose por la punta. Si a esto añadimos las pérdidas posibles por las imperfecciones del corte, llegamos a la conclusión de que el optodo en transmisión presenta una mayor inmunidad a las interferencias de la fuente.

También es importante la estabilidad del sistema. Los sensores en los que se modifica el campo evanescente (en transmisión) son mucho más sensibles a las torsiones y movimientos de la fibra óptica. El riesgo de ruptura también es mucho mayor en este tipo de sensores, ya que el hecho de eliminar la cubierta aumenta de forma considerable su fragilidad. Por lo tanto, desde el punto de vista de la manipulación y la estabilidad del sistema, el sensor en reflexión sería una mejor opción.

No se podría decir, por lo tanto, que una configuración sea mejor que otra, depende en todo caso, de las necesidades requeridas para cada aplicación.

Si lo que se desea es un sensor manejable, cuyo proceso de fabricación sea automatizado, y además se dispone de una fuente de luz con potencia suficiente, lo aconsejable sería elegir la configuración en reflexión.

Sin embargo, si el sistema de medida no va a presentar una fuente de luz con potencia suficiente, y en este caso, las pérdidas pueden ser fundamentales, y que además el sistema no va a estar sometido a movimientos o vibraciones, lo más adecuado sería usar un sensor en transmisión.

Los resultados obtenidos tras este trabajo de investigación se pueden resumir en:

1. Se ha desarrollado un optodo en configuración reflexión para determinar COVs tales como etanol, metanol y ácido acético, utilizando un nuevo compuesto vapocrómico de oro como fase sensora, sintetizado por reacción entre $\text{NBU}_4[\text{Au}(\text{C}_6\text{F}_5)_2]$ con $\text{Ag}(\text{SO}_3\text{CF}_3)$ y la posterior adición de 2,2'-bipiridina⁸⁷.
2. El estudio experimental, y por tanto los resultados obtenidos, se han dividido en dos grandes bloques: por un lado se estudia la situación de no-saturación de vapor dentro de la celda de medida, es decir, introduciendo cantidades menores a 38.2 μL de etanol, 56.4 μL de metanol y 10.3 μL de ácido acético. Estos valores se obtienen de la siguiente manera:

$$(P_{\text{aire}} + P_{\text{vapor}}) \cdot V_{\text{celda}} = (n_{\text{aire}} + n_{\text{vapor}}) \cdot R \cdot T$$

$$n_{\text{vapor}} = \frac{(P_{\text{aire}} + P_{\text{vapor}}) \cdot V_{\text{celda}}}{R \cdot T} - n_{\text{aire}}$$

Siendo:

$P_{\text{aire}} = 1 \text{ atm}$; $P_{\text{vapor}} = 43.51 \text{ mm Hg}$ para el etanol, 92.5 mm Hg para el metanol y 12 mm Hg para el ácido acético; $V_{\text{celda}} = 0.275 \text{ L}$; $R = 0.082 \text{ atm L mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$; $T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$ y $n_{\text{aire}} = 0.011445933 \text{ moles}$.

$$V_{\text{saturación}} (\text{mL}) = \frac{n_{\text{vapor}} (\text{mol}) \cdot PM (\text{g} \cdot \text{mol}^{-1})}{\text{densidad} (\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})}$$

De esta forma, se establece una relación lineal entre la disminución de la señal recibida por el detector, cuando el VOC entra en contacto con la

⁸⁷ Luquin A., Barrián C., Vergara E., Cerrada El, Garrido J., Matías I.R., Laguna M., *New preparation of gold-silver complexes and optical fibre environmental sensors based on vapochromic $[\text{Au}_2\text{Ag}_2(\text{C}_6\text{F}_5)_4(\text{phen})_2]n$* , Applied Organometallic Chemistry 19, 1232 (2005).

fase sensora situada en la punta de la fibra óptica, y la concentración de VOC presente en la celda. Límites de detección de 2.16 mg/L para el etanol, 1.73 mg/L para el metanol y 3.73 mg/L para el ácido acético se obtienen con este sistema sensor con desviaciones estándares de 0.7, 1.4 y 1.7% respectivamente para el etanol, metanol y ácido acético.

3. De igual forma se han realizado estudios en condiciones de saturación de vapor dentro de la celda. En este caso, al introducir en la celda volúmenes iguales o mayores a los descritos en el punto anterior, la concentración de vapor dentro de la celda es siempre la misma, y la disminución en la potencia óptica tiene siempre el mismo valor, sin embargo las cinéticas de esas disminuciones no son iguales. Se ha encontrado una relación lineal entre la pendiente de esa bajada de la señal y el volumen de líquido introducido en la celda de medida.

Se observa que el tiempo de respuesta del sensor a los diferentes VOCs es distinto (rectas con diferentes pendientes), por lo que aunque se estuviera en situación de saturación dentro de la celda, podríamos cuantificar volúmenes de VOC introducidos y diferenciar claramente entre los diferentes VOCs, puesto que las pendientes de sus curvas de calibración son distintas.

Así, se obtienen límites de detección de 68.6, 55 y 118.8 μ L de etanol, metanol y ácido acético respectivamente con unas desviaciones estándares inferiores en todos casos al 2%.

4. Se realizaron medidas dentro de una cámara climática para comprobar cómo afecta la humedad y la temperatura al optodo desarrollado, comprobando así cómo reacciona el sensor ante diferentes condiciones ambientales. Cada uno de los tres ciclos realizados, de cuatro horas cada uno, mantenía la temperatura constante a 20, 40 y 60°C y variaba la humedad desde un 15 a un 85%. Se comprobó que la señal que recibía el detector por parte del optodo era estable durante estos cambios (cambios menores a 0.1 dB en la señal recibida).

5. Se realizaron estudios con un optodo en configuración en transmisión, pudiendo comprobar que esta configuración era más sensible a las torsiones y movimientos de la fibra óptica, menos reproducible porque el método de deposición de la fase sensora es mucho más manual, pero sin embargo, permite obtener mayores potencias recibidas por el detector, al introducir menos pérdidas su montaje experimental.

PARTE B

TÉCNICAS SEPARATIVAS AVANZADAS

B-1. Electroforesis Capilar (CE)

1. Introducción

El proceso electroforético fue antaño definido como “el movimiento diferencial o migración de iones en disolución por atracción o repulsión en un campo eléctrico”. En términos prácticos, un electrodo positivo (ánodo) y uno negativo (cátodo) se colocan en una disolución conteniendo iones. Luego, cuando se aplica un voltaje a los electrodos, los iones de diferente carga, aniones y cationes, se mueven a través de la disolución hacia el electrodo de carga opuesta.

La CE es, por tanto, una técnica que desarrolla lo anteriormente dicho en estrechos capilares, normalmente de 25 a 100 μm de diámetro interno (i.d.), rellenos de una disolución de separación (o disolución electroforética de trabajo) que suele ser una disolución reguladora.

Las primeras experiencias separativas utilizando los principios electroforéticos fueron realizadas por Arne Tiselius¹ usando un tubo en U que contenía disoluciones libres o no soportadas separadas por delimitadores que se movían por el voltaje impuesto. Por el desarrollo del primer aparato denominado *celda electroforética* en 1937, Tiselius fue galardonado con el premio Nobel en el 1948. Los posteriores estudios sobre electroforesis fueron llevados a cabo en columnas y en soportes planos humedecidos con líquido, generalmente disoluciones acuosas. Los soportes o materiales planos pueden ser de papel o sílica (semejante a cromatografía en capa fina), o una variedad de geles como es el almidón o el poliacrilato. Las técnicas planas pueden ser denominadas con una gran variedad de nombres, incluyendo *electroforesis en zona* o *electroforesis en gel*. Estas separaciones por electroforesis convencional, han sido y siguen siendo muy eficaces y de muy extensa aplicación, principalmente en la identificación o

¹ Tiselius A., *A new apparatus for electrophoretic analysis of colloidal mixtures*, Trans. Faraday Soc. 33, 524 (1937).

cuantificación de macromoléculas, especialmente proteínas. Sin embargo, dichas separaciones presentan una serie de inconvenientes:

- ✘ Son técnicas lentas y laboriosas
- ✘ Tienen tendencia a ser poco reproducibles
- ✘ No permiten la automatización.

El uso de capilares en vez de superficies planas en electroforesis supuso una gran novedad ya que hizo viable eliminar el calentamiento por efecto Joule que acompaña a los fenómenos electroforéticos; fue entonces cuando comenzó una nueva forma de electroforesis que se denominó *electroforesis capilar*.

Esta técnica separativa fue descrita originalmente como electroforesis libre a finales de los años 60 (1967), cuando Hjertén² utilizó capilares de 3 mm de i.d. empleando campos eléctricos altos. Pero no fue hasta 1974 cuando Virtanen³ describió las ventajas de usar capilares con diámetros tan pequeños.

Todos estos primeros trabajos sobre CE se llevaron a cabo con instrumentación adaptada de la electroforesis convencional y no fue hasta 1979 cuando Mikkers y col.⁴ Demostraron el uso de capilares de teflón con diámetros internos de 200 µm para la electroforesis libre.

Todas las expectativas que en su día se generaron se han logrado y como resultado hoy día la CE se ha convertido en una técnica popular complementaria a la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). La CE ofrece la ventaja de que el desarrollo de los métodos es mucho más predecible que en HPLC; la migración electroforética sigue unas reglas concretas y simples, mientras que las interacciones moleculares en HPLC son mucho más complejas. Se puede decir que la CE combina el poder de separación de la electroforesis convencional con la automatización propia del HPLC.

² Hjertén S., *High performance electrophoresis*, Chromatogr. Rev. 9, 122 (1967).

³ Virtanen R., *Zone electrophoresis in a narrow-bore tube employing potentiometric detection*, Acta Polytech. Scand. 123, 1 (1974).

⁴ Mikkers F., Everaerts F., Verheggen T., *High performance zone electrophoresis*, J. Chromatogr. 169, 11 (1979).

Las principales características de la CE son:

- ✓ Elevada rapidez de análisis.
- ✓ Elevadas eficacias, normalmente en el intervalo de 10^5 - 10^6 platos teóricos por metro de columna.
- ✓ Requerimiento pequeño de volúmenes de muestra (del orden de nanolitros) y reactivos.
- ✓ Gran variedad de aplicaciones.
- ✓ Facilidad de automatización.

2. Instrumentación en CE

La instrumentación necesaria en CE se basa en un diseño bastante simple (Figura B-1).

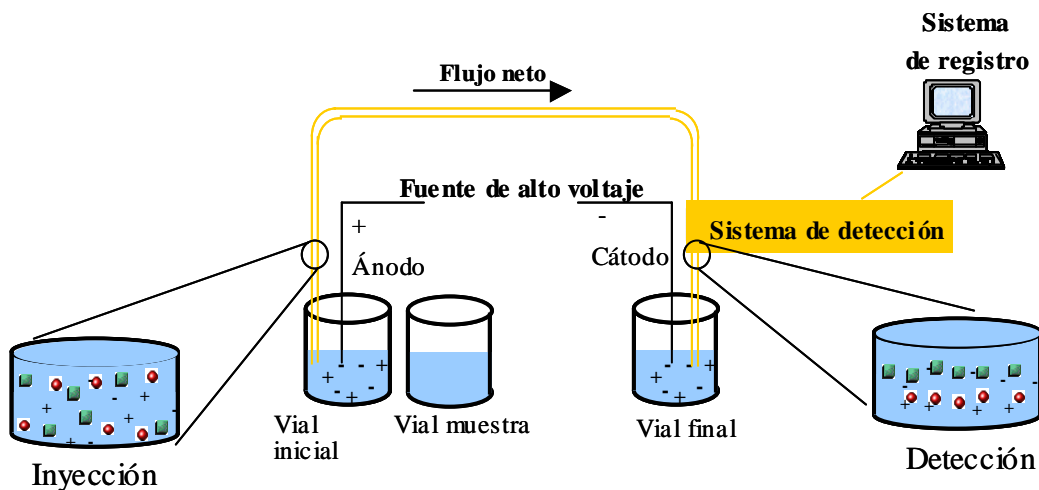


FIGURA B-1. Esquema básico de un instrumento en CE

La CE es muy fácil de automatizar y existen equipos comerciales equiparables a los ampliamente conocidos de HPLC. Los componentes básicos de estos equipos consisten en un automuestreador, un módulo de detección, una fuente de alto voltaje, el capilar y un ordenador para controlar el instrumento. La fuente de alto voltaje es equivalente a las bombas en HPLC y los capilares (normalmente de sílice fundida recubiertos de poliimida) equivalen a la columna, por lo que la instrumentación es

bastante semejante y esto se hace especialmente evidente en los programas usados para controlar los equipos de CE que están basados principalmente en los *software* existentes para HPLC.

Los extremos del capilar se colocan en dos viales rellenos de disolución de separación que contienen cada uno de ellos un electrodo, ambos conectados a una fuente de alto voltaje capaz de alcanzar voltajes de hasta 30 kV (existen incluso aplicaciones desarrolladas a voltajes superiores). La muestra se inyecta dentro del capilar sustituyendo temporalmente el vial inicial con disolución de separación (usualmente el ánodo) por un vial que contiene la muestra a separar y aplicando un potencial eléctrico o una presión externa durante unos segundos. A la primera forma se le denomina inyección electrocinética y a la segunda hidrodinámica. Después se vuelve a reemplazar el vial de muestra por el inicial conteniendo la disolución de separación y se aplica un potencial eléctrico a lo largo del capilar que produce la separación. Los analitos pueden ser detectados directa o indirectamente con detección óptica (UV-visible, fluorimétrica, fosforimétrica, quimioluminiscente o infrarroja) a través de la ventana del capilar que habitualmente se encuentra cerca del extremo opuesto a donde se hizo la inyección, normalmente cerca del cátodo (detección on-column), o al final del capilar mediante el uso de otros sistemas de detección como la espectrometría de masas o las técnicas eléctricas (detección off- o post-columna).

3. Principios de separación en CE

La separación en CE se produce al migrar los solutos a través del capilar después de la aplicación de un determinado voltaje, pero posteriormente es necesario determinar y cuantificar los componentes que, previamente, se han separado.

La pared interna del capilar tiene grupos silanoles (SiO_x) que, en contacto con el tampón de separación, se ionizan. El grado de ionización se controla principalmente mediante el pH del electrolito de separación

(aparecen cargas negativas con disoluciones de pH superior a 3). De este modo, la pared cargada negativamente atrae a los iones con carga positiva del tampón, creando una doble capa eléctrica. Esta doble capa tiene dos zonas, una compacta próxima a la pared del capilar y en la cual las interacciones que se dan entre los grupos cargados negativamente de la sílice y los contraiones del tampón son tan grandes que compensan la agitación térmica; y otra más alejada de la pared, denominada *difusa*, con interacciones más débiles con los silanos cargados, pudiéndose producir agitación térmica. Bajo la acción del campo eléctrico, las cargas positivas de la zona difusa se desplazan hacia el cátodo y arrastran con ellas el agua de solvatación que llevan asociada. El resultado de este fenómeno es un movimiento global de todas las especies en el interior del capilar, que viene determinado por la movilidad electroosmótica⁵⁻⁷:

$$\mu_{eo} = \frac{\varepsilon \xi}{4\pi\eta}$$

donde ε es la constante dieléctrica del tampón, η su viscosidad y ξ o potencial zeta es el potencial que se genera aproximadamente entre la superficie del capilar y el tampón. Al emplear electrolitos con concentraciones muy altas, el espesor de la capa difusa de la doble capa eléctrica disminuye y el de la zona compacta aumenta, el potencial zeta entonces disminuye, y en la misma proporción lo hace μ_{eo} . El flujo electroosmótico (EOF) va a afectar a todas las sustancias en el interior del capilar del mismo modo, ya que se trata de una propiedad del sistema capilar-tampón. Una de las características más importantes de este flujo es que tiene el perfil prácticamente plano, lo que hace posible la obtención de elevadas eficacias.

Bajo la presencia de un campo eléctrico, las sustancias cargadas sufren además el proceso de electromigración, por el cual los analitos en el interior del capilar tienden a migrar hacia su polo correspondiente al verse

⁵ Oda R.P., Landers J.P. en Landers J.P. (Ed.), *Handbook of Capillary Electrophoresis*, CRC Press, pp 1-49 (1997).

⁶ Cruces Blanco C. en *Electrophoresis Capilar*, Ed. Univ. Almería (1998).

⁷ Marina M.L., Ríos A., Valcárcel M., *Fundamentals of Capillary Electrophoresis in Analysis and Detection by Capillary Electrophoresis*, Ed. M.L. Marina,

sometidos a la fuerza generada por el campo eléctrico. Por otro lado aparece también una fuerza de rozamiento que se opone a la eléctrica. Durante la separación ambas fuerzas se igualan, de modo que los iones adoptan un movimiento rectilíneo uniforme, cuya velocidad de migración puede ser expresada como:

$$v_e = \mu_e E$$

donde v_e es la velocidad de migración de cada ión ($m s^{-1}$), μ_e la movilidad electroforética ($m^2 V^{-1} s^{-1}$) y E es el campo eléctrico aplicado ($V m^{-1}$). La intensidad del campo eléctrico es función del voltaje aplicado dividido por la longitud total del capilar. La movilidad electroforética es un factor que indica cómo de rápido se mueve un ión o soluto a través de la disolución de separación. Ésta es una expresión del balance de fuerzas que actúan sobre cada ión individual: la fuerza del campo eléctrico actúa a favor del movimiento y las fuerzas de fricción y rozamiento, en contra. La ecuación que describe la movilidad electroforética es:

$$\mu_e = \frac{q}{6\pi\eta r}$$

donde q es la carga del ión, η es la viscosidad de la disolución y r es el radio de la partícula o ión en disolución. La carga del ión, q , es estable para los iones totalmente disociados, como son ácidos fuertes o pequeños iones, pero puede estar afectada por cambios de pH en el caso de ácidos o bases débiles. El radio del ión, r , puede estar afectado por el contraión presente o por los agentes complejantes utilizados. De la ecuación anterior se puede ver que las diferencias en las movilidades electroforéticas serán causadas por las diferencias en la relación entre la carga y el tamaño del ión. Elevada carga y pequeño tamaño confieren una gran movilidad, mientras que una baja carga y un gran tamaño confieren una baja movilidad.

En los capilares sin recubrimiento interno, se dan simultáneamente la migración electroforética y electroosmótica de los componentes de la muestra. En estas condiciones, la velocidad que van a adoptar las sustancias dentro del capilar va a ser la suma (o la resta) resultante de los

vectores electroosmótico y electroforético, que van a depender de las condiciones de separación y de la carga y volumen de los analitos. De aquí la siguiente expresión de dicha velocidad:

$$v = (\mu_{eo} \pm \mu_e)E$$

El tiempo de migración de la sustancia cargada vendrá dado por la expresión:

$$t_m = \frac{L}{(\mu_{eo} \pm \mu_e)E}$$

donde L es la longitud del capilar hasta el punto de detección.

4. Modos en CE

Es ampliamente reconocido que la CE es una técnica muy versátil, y esto es debido en parte por los distintos modos de separación disponibles. Los modos de CE más comunes están resumidos en la Tabla B-1, junto con el principio de separación de cada uno de ellos.

TABLA B-1. Modos de separación en CE

Modo de separación (acrónimo)	Principio de separación
Electroforesis capilar en zona (CZE)	Carga / tamaño
Cromatografía capilar electrocinética micelar (MEKC)	Interacción hidrofóbica/iónica con micelas del surfactante
Electroforesis capilar quiral (CCE)	Formación de complejos estereoespecíficos
Electroforesis capilar por afinidad (CAE)	Interacciones moleculares entre ligando y analito "objetivo"
Cromatografía capilar electrocinética micelar con microemulsiones (MEEKC)	Mecanismos electroforéticos y reparto cromatográfico
Electroforesis capilar en gel (CGE)	Tamaño molecular
Isoelectroenfoco capilar (CIEF)	Punto isoeléctrico
Isotacoforesis capilar (CITP)	Capacidad de migración entre tampones de distinta naturaleza
Electrocromatografía capilar (CEC)	Movilidad en una solución libre y retención cromatográfica

Los diferentes mecanismos de separación empleados hacen que estos modos sean complementarios entre sí. En algunos casos, una separación puede ser realizada satisfactoriamente por más de un modo electroforético.

Una de las grandes ventajas de la CE es que para cambiar de modo puede bastar simplemente con variar la composición de la disolución

reguladora empleada. A efectos prácticos esto significa que dos modos electroforéticos pueden ser utilizados en análisis sucesivos usando el mismo capilar. Este hecho contrasta con HPLC, donde para cambiar de modo, normalmente se ha de cambiar tanto la fase móvil como la columna.

4.1. Electroforesis capilar en zona

El más versátil y simple de los modos en CE es conocido como electroforesis capilar en zona (CZE) o electroforesis capilar en zona libre. Es por ello por lo que este modo es el más empleado teniendo un amplio rango de aplicaciones.

El mecanismo de separación se basa en las diferencias en la relación carga/masa de las diferentes sustancias que componen una muestra. Estas diferencias implican distintas movilidades electroforéticas y, por tanto, diferentes velocidades de migración de las especies iónicas en el medio electroforético que contiene el capilar. Este mecanismo de separación permite la separación de mezclas de aniones y cationes, aunque las especies neutras no podrán ser separadas.

Cuando la muestra ha sido inyectada, se aplica el voltaje de separación y dicha muestra se moverá a través del capilar a causa del EOF, mientras que los componentes individuales se separarán en zonas de diferente migración y su separación tendrá lugar a medida que se mueven dentro del capilar debido a las diferencias en sus movilidades electroforéticas.

El orden de elución es determinado por la relación carga/tamaño de los analitos, siendo el mismo: cationes, sustancias neutras y aniones, aunque como se ha indicado las sustancias neutras no se separan (Figura B-2).

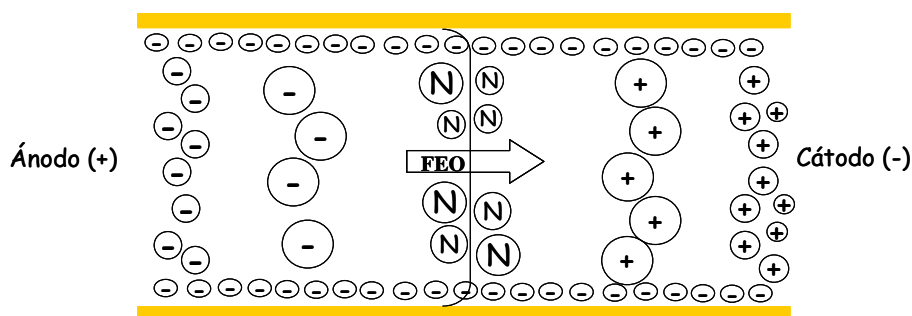


FIGURA B-2. Representación esquemática de una separación en CZE

Los cationes se mueven a través del capilar en la misma dirección que el EOF, por lo que sus velocidades de migración serán más rápidas que el propio EOF. Las moléculas neutras, que se mueven a través del capilar empujadas sólo por el EOF, eluyen después de los cationes, pero sin separarse. Los aniones, finalmente, al poseer carga negativa, tenderán a moverse hacia el ánodo en sentido opuesto al EOF, pero como generalmente éste es mayor que las velocidades electroforéticas de los aniones, éstos se desplazan hacia el cátodo eluyendo en último lugar.

Hay numerosas aplicaciones de este modo de separación, incluyendo aniones y cationes inorgánicos⁸⁻¹³, moléculas pequeñas contenidas en productos farmacéuticos o biomoléculas grandes¹⁴⁻²⁰ y en otros campos de la Química Analítica²¹⁻²⁶.

8 Harrold M.P., Wojtusik M.J., Riviello J., Henson P., *Parameters influencing separation and detection of anions by capillary electrophoresis*, J. Chromatogr. 640, 463 (1993).

9 Fernández A., Cruces C., Cortacero S., Segura A., *Sensitive determination of inorganic anions at trace levels in samples of snow water from Sierra Nevada (Granada, Spain) by capillary ion electrophoresis using calyx[4]arene as selective modifier*, Chromatographia 52, 413 (2000).

10 Jandik P., Jones W.R., *Optimization of detection sensitivity in the capillary electrophoresis of inorganic anions*, J. Chromatogr. 546, 431 (1991).

11 Xu J., Che P., Ma Y.F., *More sensitive way to determine iron using an iron(II)-1,10-phenanthroline complex and capillary electrophoresis*, J. Chromatogr. A 749, 287 (1996).

12 Friedberg M.A., Hinsdale M.E., Shihabi Z.K., *Analysis of nitrate in biological fluids by capillary electrophoresis*, J. Chromatogr. A 781, 491 (1997).

13 Ferslew K.E., Hagardorn A.N., Harrison M.T., McCormick W.F., *Capillary ion analysis of potassium concentrations in human vitreous humor*, Electrophoresis 19, 6 (1998).

14 Lehmann R., Koch M., Voelter W., Haring H.U., Liebich H.M., *Routine serum protein analysis by capillary zone electrophoresis: clinical evaluation*, Chromatographia 45, 390 (1997).

15 McFarlane R.D., Bondarenko P.V., Cockrill S.L., Cruzado I.D., Koss D., McNeal C.J., Spiekerman A.M., *Development of a lipoprotein profile using capillary electrophoresis and mass spectrometry*, Electrophoresis 18, 1796 (1997).

Un problema de la CZE es la tendencia de algunos cationes de adsorberse sobre la pared del capilar cargado negativamente. Este efecto supone un gran problema en la separación de proteínas, cuyas separaciones pues son llevadas a cabo a menudo a bajos valores de pH donde la carga del capilar es mínima²⁷. Alternativamente, los capilares se pueden recubrir con aditivos²⁸⁻³⁰.

La fase móvil o disolución de separación es usualmente en esta metodología, una disolución reguladora acuosa, aunque ya existen numerosos estudios de separaciones usando medios no acuosos.

-
- 16 Jolliff C.R., Blessum C.R., *Comparison of serum protein electrophoresis by agarose gel and capillary zone electrophoresis in a clinical setting*, *Electrophoresis* 18, 1781 (1997).
 - 17 Henskens Y., de Winter J., Pekelharing M., Ponjee G., *Detection and identification of monoclonal gammopathies by capillary electrophoresis*, *Clin. Chem.* 44, 1184 (1998).
 - 18 Bienvenu J., Graziani M.S., Arpin F., Bernon H., Blessum C., Marchetti C., Righetti G., Somenzini M., Verga G., Aguzzi F., *Multicenter evaluation of the Paragon CZE (TM) 2000 capillary zone electrophoresis system for serum protein electrophoresis and monoclonal component typing*, *Clin. Chem.* 44, 599 (1998).
 - 19 Liu C.C., Huang J.S., Tyrrell D.L.J., Dovichi N.J., *Capillary electrophoresis-electrospray-mass spectrometry of nucleosides and nucleotides: application to phosphorylation studies of anti-human immunodeficiency virus nucleosides in a human hepatoma cell line*, *Electrophoresis* 26, 1424 (2005).
 - 20 Siren H., Kuldvee R., Karla T., Ekstrom T., Riekkola M.L., *Capillary zone electrophoresis of cationic and anionic drugs in methanol*, *J. Chromatogr. A* 1068, 89 (2005).
 - 21 Klampfl C.W., *Analysis of organic acids and inorganic anions in different types of beer using capillary zone electrophoresis*, *J. Agr. Food Chem.* 47, 987 (1999).
 - 22 Kaniansky D., Masar M., Madajova V., Marak J., *Determination of sorbic acid in food-products by capillary zone electrophoresis in a hydrodynamically closed separation compartment*, *J. Chromatogr. A* 677, 179 (1994).
 - 23 Recio I., Ramos M., Amigo L., *Study of the polymorphism of ovine alpha(s1)- and alpha(s2)-caseins by capillary electrophoresis*, *J. Dairy Res.* 64, 525 (1997).
 - 24 Soga T., Tajima I., Heiger D.N., *Capillary electrophoresis for the determination of forensic anions in adulterated foods and beverages*, *American Lab.* 32, 124 (2000).
 - 25 Pozdniakova S., Padarauskas A., Schwedt G., *Simultaneous determination of iron(II) and iron(III) in water by capillary electrophoresis*, *Anal. Chim. Acta* 351, 41 (1997).
 - 26 DabekZlotorzynska E., Dlouhy J.F., Houle N., Piechowski M., Ritchie S., *Comparison of capillary zone electrophoresis with ion chromatography and standard photometric methods for the determination of inorganic anions in atmospheric aerosols*, *J. Chromatogr. A* 706, 469 (1995).
 - 27 Stutz H., *Advances in the analysis of proteins and peptides by capillary electrophoresis with matrix-assisted laser desorption/ionisation and electrospray-mass spectrometry*, *Electrophoresis* 26, 1254 (2005).
 - 28 Razunguzwa T.T., Warriar M., Timperman A.T., *ESI-MS compatible permanent coating of glass surfaces using poly(ethylene glycol)-terminated alkoxy silanes for capillary zone electrophoretic protein separations*, *Anal. Chem.* 78, 4326 (2006).
 - 29 Kato M., Imamura E., Sakai-Kato K., Nakajima T., Toyo'oka T., *Cationic amylopectin derivatives as additives for analysis of proteins in capillary electrophoresis*, *Electrophoresis* 27, 1895 (2006).
 - 30 Horvath J., Dolnik V., *Polymer wall coatings for capillary electrophoresis*, *Electrophoresis* 22, 644 (2001).

La CZE con disoluciones de separación no acuosas está basada en el uso de disoluciones de electrolito preparadas en disolventes orgánicos puros o mezclas de éstos, y hoy día es una alternativa muy interesante al uso de disoluciones reguladoras tradicionales acuosas, o acuosas con alguna proporción de disolvente orgánico³¹. Esta metodología se conoce como NACE (non-aqueous capillary electrophoresis).

En primer lugar, los disolventes orgánicos permiten solubilizar compuestos insolubles en agua y así afrontar la separación de sustancias apolares³². Además, otra de las características atractivas de la CZE en medios no acuosos es que proporciona una amplia gama de disolventes orgánicos que pueden ser usados en este modo electroforético como medio para la disolución de separación, pudiendo elegir por sus propiedades físicas y químicas condiciones que proporcionen una óptima separación.

En la presente memoria se ha hecho uso de la metodología en zona para los tres métodos electroforéticos desarrollados, ya que debido al carácter de los analitos a estudio y la simplicidad de la metodología, era la elección más adecuada. No obstante, en esta sección introductoria de CE se va a describir el resto de metodologías electroforéticas, que creemos que serán de utilidad para el lector.

4.2. Electroforesis capilar en medios micelares

Para mejorar la aplicabilidad de la técnica y hacerla más útil incluso para moléculas neutras, una segunda fase puede ser añadida y servir como una fase pseudoestacionaria en un sentido cromatográfico. Si dicha fase está basada en la formación de micelas, la metodología se denomina electroforesis capilar en medios micelares (Micellar Electrokinetic Chromatography, MEKC).

³¹ Miller J.L., Khaledi M.G. (Eds.), *High Performance Electrophoresis*, vol. 146, Wiley, New York (1998).

³² Vaher M., Koel M., *Specific background electrolytes for nonaqueous capillary electrophoresis*, J. Chromatogr. A 1068, 83 (2005).

MEKC puede ser aplicada para la separación no sólo de sustancias neutras, sino también de analitos cargados. Se basa en el reparto de los analitos entre dos fases, que son las micelas y la disolución tampón de separación. Los analitos se reparten entre la disolución acuosa y la pseudofase micelar, generando un segundo equilibrio en el proceso de separación (Figura B-3).

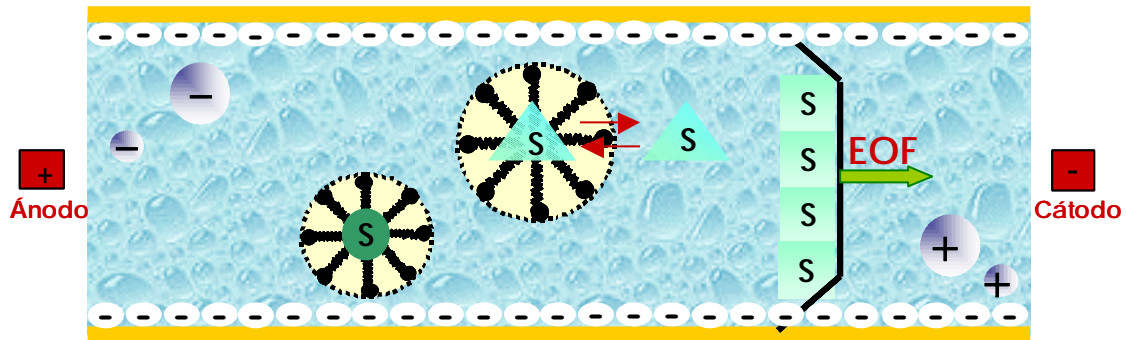


FIGURA B-3. Mecanismo de separación mediante el empleo de MEKC

Generalmente, la modalidad electroforética MEKC se lleva a cabo sólo con un medio electroforético formado con la disolución reguladora y un surfactante. Sin embargo, hay casos en los que es necesario el empleo de otras sustancias que alteran la selectividad de la separación (modificadores o aditivos).

Si bien es cierto que los disolventes orgánicos se podrían emplear como aditivos en un medio electroforético típico de la modalidad de CZE^{33,34}, la mayoría de los autores, incluyen el empleo de estos modificadores como un apartado dentro de la MEKC.

De igual manera que en HPLC un disolvente orgánico miscible con el agua se puede emplear como aditivo de la disolución para manipular los

³³ Navarrete M., Casado S., Minelli M., Segura A., Bonetti A., Dinelli G., Fernández A., *Direct determination of aliphatic acids in honey by coelectroosmotic capillary zone electrophoresis*, J. Apicultural Research 44, 65 (2005).

³⁴ Carrasco Pancorbo A., Segura Carretero A., Fernández Gutiérrez A., *Co-electroosmotic capillary electrophoresis determination of phenolic acids in comercial olive oil*, J. Sep. Sci. 28, 925 (2005).

factores de capacidad o de selectividad, en MEKC se pueden emplear disolventes orgánicos para modificar la selectividad de la separación, pero a concentraciones no excesivamente elevadas, ya que si no se rompería la estructura micelar.

4.3. Separaciones quirales

La CE puede emplearse para llevar a cabo separaciones quirales. Realmente, este tipo de separaciones no conforma un modo distinto de CE, sino más exactamente, el uso de aditivos específicos a los tampones utilizados en CZE o MEKC para conseguir una selectividad quiral adicional^{35,36}. Como es bastante similar a MEKC, algunos autores consideran este modo como un subapartado dentro de la MEKC.

Las aplicaciones más comunes de CE quiral emplean ciclodextrinas (CDs) como aditivos, bien en CZE^{37,38}, o especialmente en MEKC^{39,40}. Aunque existen otros receptores estereoselectivos que también pueden ser usados, como son los ésteres corona o las sales biliares.

En MEKC las CDs se emplean con frecuencia con micelas de SDS. Al ser la superficie de la CD hidrofílica, se puede asumir que ésta no se incorpora en la micela. Sin embargo, una molécula de surfactante se podría incluir en la cavidad de la CD. La separación se logra por las diferencias en la distribución de los solutos entre las CDs y las micelas. La cantidad de soluto dentro de una micela depende de su hidrofobicidad, mientras que la cantidad de soluto dentro de la CD depende de la capacidad de encajar dentro de la cavidad de la misma, así como también de su hidrofobicidad.

³⁵ Rogan M.M., Altria K.D., *Introduction to the Theory and Applications of Chiral Capillary Electrophoresis*, Part Number 726388. Beckman Instruments. Fullerton, CA (1995).

³⁶ Gubitz G., Schmid M.G., *Recent advances in chiral separation principles in capillary electrophoresis and capillary electrochromatography*, *Electrophoresis* 25, 3981 (2004).

³⁷ Shi Y.J., Huo C.H., Yao H.J., Gao R.F., Zhao Y.Y., Xu B.J., *Enantioseparation of 2-O-beta-D-glucopyranosyl-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one and its 7-chloro-derivative by capillary zone electrophoresis using native and substituted beta-cyclodextrins as chiral additives*, *J. Chromatogr. A* 1072, 279 (2005).

³⁸ Salami M., Jira T., Otto H.H., *Capillary electrophoretic separation on enantiomers of amino acids and amino acid derivatives using crown ether and cyclodextrin*, *Pharmazie* 60, 181 (2005).

³⁹ Terabe S., Miyashita Y., Ishihama Y., Shibata O., *Cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography-separation of hydrophobic and enantiomeric compounds*, *J. Chromatogr.* 636, 47 (1993).

⁴⁰ Wren S.A.C., *Chiral separation in capillary electrophoresis*, *Electrophoresis* 16, 2127 (1995).

4.4. Cromatografía capilar electrocinética micelar con microemulsiones

Las microemulsiones son líquidos totalmente transparentes formados por gotas de un disolvente orgánico lipofílico inmisible (con un tamaño de nanómetros) en un sistema acuoso. En las ciencias separativas, las microemulsiones han sido empleadas como fase móvil en HPLC, y como disoluciones reguladoras en CE. Este último uso da como resultado una modalidad electroforética muy parecida a la MEKC, la cromatografía capilar electrocinética micelar con microemulsiones (MEEKC). Las microemulsiones de aceite-en-agua se emplean normalmente en las separaciones en MEEKC, y contienen gotitas de aceite (por ejemplo, heptano u octano) suspendidas en una disolución reguladora acuosa. Las moléculas de surfactante, habitualmente SDS, son añadidas en una concentración mayor que su concentración micelar crítica, para facilitar la formación de las gotas al disminuir la tensión superficial. Un co-surfactante (alcohol de tamaño relativamente pequeño) se suele también añadir para que haga de puente en la interfase aceite-agua, la cual disminuye aún más la tensión superficial y estabiliza el sistema de la microemulsión⁴¹⁻⁴³.

En MEEKC los solutos son separados por una combinación de mecanismos electroforéticos y reparto cromatográfico. El reparto se da entre las gotas de aceite y la continua fase acuosa. Los solutos insolubles en agua experimentan una tendencia hacia su inclusión en la gota de aceite en vez de en la fase acuosa, mientras que los analitos solubles en agua residen principalmente en la fase acuosa.

Su mayor diferencia con respecto a MEKC es la adición del disolvente orgánico lipofílico inmisible. Este disolvente se incluye en el núcleo de la micela formada por el surfactante para formar la microemulsión. Las micelas en muchos casos parecen convertirse en estructuras más abiertas que

⁴¹ Marsh A., Clark B., Broderick M., Power J., Donegan S., Altria K., *Recent advances in microemulsion electrokinetic chromatography*, *Electrophoresis* 25, 3970 (2004).

⁴² Hansen S.H., *Recent applications of microemulsion electrokinetic chromatography*, *Electrophoresis* 24, 3900 (2003).

⁴³ Altria K.D., Broderick M.F., Donegan S., Power J., *The use of novel water-in-oil microemulsions in microemulsion electrokinetic chromatography*, *Electrophoresis* 25, 645 (2004).

facilitarán una transferencia de masa más rápida. Los solutos por tanto, pueden atravesar la superficie de las gotitas en MEEKC más fácilmente que en la micela más rígida en MEKC, cosa que permite que la MEEKC pueda ser aplicada a un mayor rango de analitos.

4.5. Electroforesis capilar por afinidad

La electroforesis capilar por afinidad (CAE) es un término amplio que se refiere a la separación por CE de sustancias que participan en interacciones selectivas y no-selectivas que tienen lugar en el interior de un capilar. Las interacciones moleculares pueden ser libres en disolución o inmovilizadas en un soporte sólido. Las dos sustancias que despiertan interés en CAE son el ligando y el analito.

Las interacciones moleculares llevadas a cabo en un soporte sólido sin embargo, se emplean para que el ligando "capture" al analito de interés, que puede estar presente en un amplio rango de concentraciones y en matrices tanto simples como complejas. Cuando esto se lleve a cabo se podrá conseguir que el analito aislado esté más concentrado y bastante más puro. Esta modalidad electroforética que emplea el ligando inmovilizado se puede utilizar además, para realizar micro-reacciones en el medio electroforético.

Las ventajas de la CAE hicieron que muchos investigadores utilizaran los dispositivos "concentrator-microreactor" conectados a un equipo de CE, habiendo hoy en día un gran número de artículos referentes a este tema⁴⁴⁻⁴⁸. En los últimos años ha aumentado notablemente el número de artículos

44 Guzmán N.A., Trebilcock M.A., Advis J.P., *The use of a concentration step to collect urinary components separated by capillary electrophoresis and further characterization of collected analytes by mass-spectrometry*, J. Liq. Chromatogr. 14, 997 (1991).

45 Nashabeh W., ElRassi Z., *Enzymophoresis of nucleic-acids by tandem capillary enzyme reactor-capillary zone electrophoresis*, J. Chromatogr. 596, 251 (1992).

46 Phillips T.M., Chmielinska J.J., *Immunoaffinity capillary electrophoretic analysis of cyclosporine in tears*, J. Chromatogr. 8, 242 (1994).

47 Knudsen C.B., Beattie J.H., *On-line solid-phase extraction capillary electrophoresis for enhanced detection sensitivity and selectivity: application to the analysis of metallothionein isoforms in sheep fetal liver*, J. Chromatogr. A 792, 463 (1997).

48 Bateman K.P., White R.L., Thibault P., *Evaluation of adsorption preconcentration capillary zone electrophoresis nanoelectrospray mass spectrometry for peptide and glycoprotein analyses*, J. Mass Spectrom. 33, 1109 (1998).

que emplean esta modalidad electroforética tanto con interacciones libres en disolución, como en soporte sólido⁴⁹⁻⁵⁵.

4.6. Electroforesis capilar en gel

La electroforesis capilar en gel (CGE) opera usando capilares rellenos de gel. El mecanismo de separación en CGE se basa en las diferencias de movilidad de los componentes de la muestra debido a su tamaño molecular para migrar a través de los poros del gel que rellena el capilar, es decir, esta separación está basada en un tamizado o criba molecular. Como el principio de separación en este caso es el tamaño, este modo será particularmente apropiado para separar moléculas cargadas que tengan diferentes tamaños.

Emplear este modo de separación conlleva ciertas ventajas:

- ✓ Se previene la adsorción del soluto a las paredes del capilar.
- ✓ Son medios anticonvectivos
- ✓ El uso de los geles ayuda a eliminar el EOF
- ✓ Se minimiza la difusión del soluto

Según las características y tamaño de los componentes de una mezcla, se han de emplear distintos geles. Los dos tipos fundamentales de geles que

49 Kinoshita M., Kakehi K., Analysis of the interaction between hyaluronan and hyaluronan-binding proteins by capillary affinity electrophoresis: significance of hyaluronan molecular size on binding reaction, *J. Chromatogr. B.* 816, 289 (2005).

50 Nakajima K., Urashima T., Suzuki M., Suzuki A., Kakehi K., *Capillary affinity electrophoresis for the analysis of carbohydrates derived from milk and glycosphingolipids*, *Glycobiology* 14, 1190, (2004).

51 Nakajima K., Kinoshita M., Oda Y., Masuko T., Kaku H., Shibuya N., Kakehi K., *Screening method of carbohydrate-binding proteins in biological sources by capillary affinity electrophoresis and its application to determination of Tulipa gesneriana agglutinin in tulip bulbs*, *Glycobiology* 14, 793 (2004).

52 Oda Y., Senaha T., Matsuno Y., Nakajima K., Naka R., Kinoshita M., Honda E., Furuta I., Kakehi K., *A new fungal lectin recognizing alpha(1-6)-linked fucose in the N-glycan*, *J. Biol. Chem.* 278, 32439 (2003).

53 Kuhn R., Frei R., Christen M., *Use of capillary affinity electrophoresis for the determination of lectin sugar interactions*, *Anal. Biochem.* 218, 131 (1994).

54 Uegaki K., Taga A., Akada Y., Suzuki S., Honda S., *Simultaneous estimation of the association constants of glycoprotein glycoforms to a common protein by capillary electrophoresis*, *Anal. Biochem.* 309, 269 (2002).

55 Guzmán N.A., Stubbs R.J., *The use of selective adsorbents in capillary electrophoresis-mass spectrometry for analyte preconcentration and microreactions: a powerful three-dimensional tool for multiple chemical and biological applications*, *Electrophoresis* 22, 3602 (2001).

se emplean en CGE son los geles físicos, dentro de los cuales destaca la agarosa; y los geles químicos, que se preparan por polimerización de la acrilamida en presencia de agentes que produzcan enlaces cruzados para dar una matriz de poliacrilamida. Estos geles de poliacrilamida pueden ser entrecruzados y lineales.

Esta modalidad electroforética está siendo ampliamente utilizada para la secuenciación de ADN⁵⁶⁻⁵⁸.

4.7. Isoelectroenfoque capilar

Como su propio nombre sugiere, el modo de separación llamado isoelectroenfoque capilar (CIEF) separa los analitos atendiendo a las diferencias entre sus puntos isoeléctricos.

Generalmente este modo electroforético se emplea para separar analitos de carácter anfótero, como las proteínas o los polipéptidos⁵⁹⁻⁶¹. Los anfóteros son compuestos anfóteros que pueden existir como aniones o cationes dependiendo del pH de la disolución en la que se encuentren. El pH al cual el anfótero es neutro se denomina punto isoeléctrico (pI). A un valor de pH menor del pI el anfótero se encuentra como catión, y por encima del pI, como anión.

Podemos decir pues, que la separación por CIEF se basa en la migración electroforética de sustancias anfóteras en un gradiente de pH. Para realizar una separación empleando este principio, el extremo anódico del capilar tendrá que estar sumergido en una disolución ácida, mientras que el

⁵⁶ Chen D.Y., Harke H.R., Dovichi N.J., *2-label peak-height encoded DNA sequencing by capillary gel-electrophoresis - three examples*, Nucleic Acids Res. 20, 4873 (1992).

⁵⁷ Bay S., Starke H., Zhang J.Z., Elliot J.F., Coulson L.D., Dovichi N.J., *Capillary gel electrophoresis for DNA sequencing of a template from the malaria genome by use of 4%T, 5%C polyacrylamide and two-color peak-height encoded fluorescence detection*, J. Capillary Electrophoresis 1, 121 (1994).

⁵⁸ Manabe T., Chen N., Terabe S., Yohda M., Endo I., *Effects of linear polyacrylamide concentrations and applied voltajes on the separation of oligonucleotides and DNA-sequencing fragments by capillary electrophoresis*, Anal. Chem. 66, 4243 (1994).

⁵⁹ Righetti P.G., Gelfi C., *Isoelectric focusing in capillaries and slab gels: a comparison*, J. Cap. Elec. 1, 27 (1994).

⁶⁰ Schwer C., *Capillary-isoelectric focusing: a routine method for protein analysis*, Electrophoresis 16, 2121 (1995).

⁶¹ Chen A.B., Rickel C.A., Flanigan A., Hunt G., Moorhouse K.G., *Comparison of ampholytes used for slab gel and capillary isoelectric focusing of recombinant tissue-type plasminogen activator glycoforms*, J. Chromatogr. A 744, 279 (1996).

catódico, en una solución básica. Cuando se aplica un campo eléctrico, la presencia de los anfolitos en el interior del capilar, provoca un gradiente de pH. Los componentes cargados de la muestra migran entonces a través del capilar hasta que lleguen a una región donde el pH sea igual que su pI , momento en el que se convierten en especies neutras y, por lo tanto, cesan de migrar. El resultado final serán una serie de zonas estrechas donde se agrupan ("enfocan") los solutos hasta conseguir una condición de estado de equilibrio. Una vez que los solutos están enfocados en dichas zonas, hay que movilizarlos para que pasen a través del detector y obtener así el correspondiente electroferograma.

4.8. Isotacoforesis capilar

La isotacoforesis capilar (CITP) fue la primera variante de la electroforesis capilar que estuvo disponible comercialmente, aunque posteriormente su uso quedó un poco estancado. Este modo puede ser empleado para separar especies iónicas, pero no es posible realizar la separación de aniones y cationes durante un mismo análisis.

Se fundamenta en que las bandas de la muestra se desplazan en el interior del capilar de separación entre dos disoluciones tampón de diferente conductividad eléctrica, el llamado electrolito frontal y electrolito terminal. Es decir, la principal característica de este modo de electroforesis capilar es que tiene lugar en un sistema de tampón discontinuo. Se consigue que los distintos iones que componen la muestra sean acelerados o frenados hasta conseguir bandas estrechas donde se concentran cada uno de ellos, que se desplazan a la misma velocidad a través del capilar.

CITP opera normalmente con supresión del EOF, cosa que se consigue aumentando la viscosidad del medio, separando el capilar de los recipientes de la disolución tampón usando membranas semipermeables, o bien, revistiendo los capilares de sílice fundida.

La principal aplicación de este modo electroforético es como sistema de preconcentración de muestra previo a la separación por otros modos de

CE⁶²⁻⁶⁶, aunque también existen numerosas aplicaciones que llevan a cabo separaciones electroforéticas empleando este modo⁶⁷⁻⁶⁸.

4.9. Electrocromatografía capilar

La electrocromatografía capilar (CEC) es una técnica de separación híbrida que combina características tanto de CE como de HPLC. Como consecuencia de esto, no puede ser estrictamente considerada como un modo de CE, aunque normalmente puede operar usando una instrumentación similar a la de CE.

En CEC el capilar es empaquetado con una fase estacionaria cromatográfica, con "fritas" en ambos extremos, que puede retener los solutos por medio de equilibrios de distribución normales asociados a cromatografía.

Como el líquido está en contacto tanto con las paredes de sílica como con las partículas de sílica de la fase estacionaria, se genera flujo electroosmótico. Así, la CEC se ve favorecida por el perfil de flujo plano del EOF, el cual proporciona alta eficacia de separación. El mecanismo de separación en CEC depende en gran medida de la naturaleza de la muestra. Las moléculas neutras se separan en base a mecanismos puramente cromatográficos, mientras que los ácidos y las bases se separan por una combinación de mecanismos cromatográficos y electroforéticos.

62 Okamoto H., Timerbaev A.R., Hirokawa T., *Simultaneous determination of metal ions, amino acids, and other small biogenic molecules in human serum by capillary zone electrophoresis with transient isotachophoretic preconcentration*, J. Sep. Science 28, 522 (2005).

63 Mazereeuw M., Tjaden U.R., Reinhoud N.J., *Single capillary isotachophoresis-zone electrophoresis: current practice and prospects, a review*, J. Chromatogr. Sci. 33, 686 (1995).

64 Krivankova L., Gebauer P., Bocek P., *Some practical aspects of utilizing the online combination of isotachophoresis and capillary zone electrophoresis*, J. Chromatogr. A. 716, 35 (1995).

65 Witte D.T., Nagard S., Larsson M., *Improved sensitivity by online isotachophoretic preconcentration in the capillary zone electrophoretic determination of peptide-like solutes*, J. Chromatogr. A 687, 155 (1994).

66 Guzmán N.A., Trebilcock M.A., Advis J.P., *The use of a concentration step to collect urinary components separated by capillary electrophoresis and further characterization of collected analytes by mass-spectrometry*, J. Liq. Chromatogr. 14, 997 (1991).

67 Zgola-Grzeskowiak A., Grzeskowiak T., Zembruska J., Franska M., Franski R., Lukaszewski Z., *Isotachophoretic determination of carboxylic acids in biodegradation samples*, J. Chromatogr. A. 1068, 327 (2005).

68 Natishan T.K., *Recent progress in the analysis of pharmaceuticals by capillary electrophoresis*, J. Liquid Chromatogr. Rel. Technolog. 28, 1115 (2005).

Se puede decir que este modo de CE es una cromatografía líquida en la cual se sustituye la bomba de alta presión por un generador de alto voltaje, que se basa en procesos electroforéticos e interacciones con la fase estacionaria, que pueden ser por adsorción, partición y gel permeable en un capilar estrecho y relleno.

Existe ya un gran número de interesantes aplicaciones desarrolladas en los laboratorios de investigación analítica⁶⁹⁻⁷⁴.

5. Detectores en CE

En los últimos años las metodologías y las aplicaciones electroforéticas han progresado de un modo espectacular; sin embargo la principal limitación ha sido las posibilidades en cuanto al acoplamiento de diferentes sistemas de detección a la separación electroforética, debido principalmente a las pequeñas dimensiones del capilar utilizado, así como los pequeños volúmenes de muestra usados que hacen que la sensibilidad en la detección de las zonas ocupadas por los solutos de interés se vea afectada por la dispersión en la detección *on-line*, provocando alteraciones en la señal que, en ocasiones, son cruciales para la efectividad de la detección⁷⁵.

Cuando un detector se acopla a un sistema de separación, se deben cumplir una serie de condiciones para el buen funcionamiento como son:

- ✦ Presentar una buena sensibilidad.

⁶⁹ Sakaguchi R., Kato Y., Ito A., Tsuda T., Yoshida T., *Preparation of red blood cell column for capillary electrochromatography*, Analytical Sciences 21, 453 (2005).

⁷⁰ De Rossi A., Desiderio C., *Application of reversed phase short end-capillary electrochromatography to herbicides residues analysis*, Chromatographia 61, 271 (2005).

⁷¹ Yang L., Guihen E., Holmes J.D., Loughran M., O'Sullivan G.P., Glennon J.D., *Gold nanoparticle-modified etched capillaries for open-tubular capillary electrochromatography*, Anal. Chem. 77, 1840 (2005).

⁷² Aturki Z., D'Orazio G., Fandli S., *Rapid assay of vitamin E in vegetable oils by reversed-phase capillary electrochromatography*, Electrophoresis 26, 798 (2005).

⁷³ Ohyama K., Wada M., Lord G.A., Ohba Y., Nakashima M.N., Nakashima K., Akiyama S., Lim C.K., Kuroda N., *Capillary electrochromatography of caffeine and its metabolites in rat brain microdialysate*, Electrophoresis 26, 812 (2005).

⁷⁴ Yokoyama T., Zenki M., Macka M., Haddad P.R., *Enhancement of separation capability of inorganic ions by capillary electrochromatography*, Bunseki Kagaku 54, 107 (2005).

⁷⁵ Fernández Gutiérrez A., Segura Carretero A., Carrasco Pancorbo A. en *Electroforesis Capilar: aproximación según la técnica de detección*, Ed. Univ. Granada, pp. 11-54 (2005).

- ✦ Proporcionar límites de detección bajos; para ello es necesaria la combinación de una alta sensibilidad con una baja fluctuación en la señal de fondo.
- ✦ A veces es necesario que el detector presente una determinada selectividad a una serie de analitos o a uno determinado, evitando así posibles interferencias en la señal por parte de otras sustancias presentes en la muestra.
- ✦ La respuesta del detector debe ser rápida ante un cambio en la concentración de analito.
- ✦ La presencia del detector no debe perjudicar a la eficacia de la separación.
- ✦ Proporcionar señales fiables; esto implica principalmente que las señales deben ser reproducibles y estables en el tiempo.
- ✦ Idealmente, la señal debe ser nula en ausencia de analito. La señal de fondo no debe perturbar la señal correspondiente a los analitos y conviene que sea lo más pequeña posible y/o constante posible.
- ✦ Proporcionar cambios en su señal en el margen más amplio posible de concentración o masas del analito, es decir, que presente un amplio intervalo lineal. Además, sería deseable que la relación entre la señal y la concentración fuera lineal.

Todas estas condiciones influyen en gran medida a la hora de decidir los sistemas de detección que se acoplan y además, los detectores que se pueden acoplar a CE deben ser sensibles a pequeñas cantidades de muestra y compatibles con las dimensiones físicas del capilar, aún en detrimento de otras cualidades.

Hasta ahora se han adaptado una gran variedad de técnicas de detección a la CE con diferente éxito. En la Tabla B-2 se muestran los distintos sistemas de detección y el rango de los límites de detección alcanzados en dicho acoplamiento.

TABLA B-2. Sistemas de detección en CE y rangos de límites de detección alcanzados

Sistema de detección	Límite de detección (M)
<i>Técnicas ópticas</i>	
Absorción UV-Visible	
Directa	$10^{-5} - 10^{-7}$
Indirecta	$10^{-4} - 10^{-6}$
Con paso óptico aumentado	10^{-7}
Fluorescencia	
Directa	$10^{-7} - 10^{-9}$
Indirecta	$10^{-6} - 10^{-8}$
Inducida por láser directa	$10^{-10} - 10^{-13}$
Inducida por láser indirecta	$10^{-5} - 10^{-7}$
Inducida por LED	$10^{-6} - 10^{-9}$
Fosforescencia	$10^{-6} - 10^{-8}$
Quimioluminiscencia	$10^{-5} - 10^{-11}$
Infrarrojo	$10^{-7} - 10^{-9}$
Resonancia Magnética Nuclear	$10^{-9} - 10^{-11}$ *
Dispersión Raman	$10^{-3} - 10^{-7}$
Termoóptico	$10^{-7} - 10^{-8}$
Índice de refracción	$10^{-5} - 10^{-7}$
<i>Técnicas electroquímicas</i>	
Conductimetría	$10^{-7} - 10^{-8}$
Potenciometría	$10^{-7} - 10^{-8}$
Amperometría	$10^{-7} - 10^{-9}$
<i>Otras técnicas</i>	
Espectrometría de masas	$10^{-7} - 10^{-9}$
Radiométricos	$10^{-10} - 10^{-11}$

*Para RMN-¹H (el núcleo más sensible de la tabla periódica desde el punto de vista de la RMN)

En el trabajo experimental desarrollado en la presente memoria se ha empleado la detección espectrofotométrica UV-vis, la detección fluorescente y la espectrometría de masas. A continuación pasaremos a describir de forma más detallada estos tipos de detección.

5.1. Absorción UV-visible

Los métodos basados en la absorbancia de la luz UV-visible son los más utilizados en equipos comerciales de CE, debido a su posibilidad para determinar un gran número de compuestos y grupos funcionales y su facilidad de manejo, a pesar de que su sensibilidad es mucho menor que la de otros sistemas de detección, ya que depende del diámetro interno de la columna capilar y de las absorptividades molares de los analitos. Su sencillez y relativo bajo coste son sus principales ventajas.

Este detector tiene su fundamento en la interacción entre la radiación UV-visible (zona del espectro electromagnéticos comprendida entre 200 y 800 nm aproximadamente) y la materia, dando origen al fenómeno conocido como absorción de la radiación⁷⁶.

Los capilares de sílice suelen estar recubiertos en su parte exterior de una capa de protección de poliimida que previene la transmisión UV a través de los mismos y que le atribuye una cierta protección mecánica. Para usar los capilares en CE, la capa de poliimida debe ser eliminada en una pequeña sección del capilar cerca de su extremo y la detección se lleva a cabo a través de esta ventana. Esta capa de poliimida se elimina mediante tratamiento con una pequeña llama y/o un disolvente.

Son muchas las moléculas que pueden absorber radiación UV-visible y ello hace que este modo de detección en CE pueda considerarse muy cercano al detector universal. Este comportamiento tiene ventajas pero también algunos inconvenientes. Ventajas porque al ser sensible a la gran mayoría de las especies químicas puede utilizarse para resolver, también un número elevado de los problemas analíticos que puedan presentarse.

Como inconvenientes hay que señalar que, por una parte, la disolución portadora (electrolito de separación) tiene que ser cuidadosamente

⁷⁶ Berzas J.J., Castañeda Peñalvo G., *Electroforesis capilar: aproximación según la detección*. Ed. Univ. Granada, pp 157-187 (2005).

seleccionada de manera que todos sus componentes (disolventes y solutos) sean transparentes a la radiación UV-visible empleada y, por otra parte, dado que los espectros moleculares de absorción son de bandas anchas, cualquier compuesto que coeluya con el analito interferirá en la cuantificación, muy probablemente, porque será muy difícil o imposible seleccionar una longitud de onda de medida de absorción del analito a la que el coeluyente sea totalmente transparente aunque tenga espectros bien diferenciados⁷⁷.

Consecuentemente, la utilización del detector UV-visible en CE obliga a establecer métodos en los que el capilar tenga un adecuado poder de resolución del analito respecto de todos los compuestos absorbentes contenidos en la muestra problema.

Para llevar a cabo la identificación de los compuestos en un perfil electroforético utilizando la absorción UV-visible como sistema de detección habrá que disponer de patrones comerciales o patrones aislados mediante HPLC preparativa, y hacer un estudio riguroso de los espectros de absorbancia, tiempos de retención y llevar a cabo dopados en las muestras. Aún así, con este sistema, es difícil de conseguir una identificación inequívoca.

Los detectores de absorción UV-visible pueden ser de tres tipos:

- ⊙ Longitud de onda fija: consta de una lámpara de mercurio a baja presión. A esta lámpara se le puede acoplar filtros para trabajar a otras longitudes de onda (254, 280, 360,...).
- ⊙ Longitud de onda variable: este detector trabaja en el rango del UV-visible (190-650 nm). No hace muchos años, estos detectores estaban equipados con dos lámparas, una de deuterio para trabajar de 190-360 nm, y otra de tungsteno para hacerlo en el visible de 360-650 nm, con un monocromador para seleccionar la longitud de onda

⁷⁷ Crego A.L., Marina M.L., *Análisis and detection by Capillary Electrophoresis*. Ed. Elsevier (2005). Pp 225-296.

deseada. Hoy día, con una sólo lámpara de deuterio se abarca todo el espectro de UV-visible.

- ⊙ Diodo array: este detector, el más moderno de los tres, conduce la luz mediante un sistema de diodos alineados y evita la dispersión. Un fotodiodo array (PDA) es una sucesión lineal ordenada de fotodiodos discretos en un chip de circuitos integrados. Para espectroscopía se ponen en el plano de imagen de un espectrómetro para dejar que un rango de longitudes de onda se detecte simultáneamente.

Detectores de este tipo son especialmente útiles para recoger los espectros completos de absorción UV-visible de muestras que pasan rápidamente por una celda. El PDA trabaja con el mismo principio que detectores fotovoltaicos simples. Todos los detectores de este tipo van provistos de dos celdillas, una para la muestra y otra de referencia.

5.2. Detección fluorescente

5.2.1. Principios e instrumentación

La fluorescencia es una forma de fotoluminiscencia que se puede definir como la emisión lumínica subsiguiente a la absorción de luz por ciertas moléculas. La absorción de luz es el resultado de la interacción del campo eléctrico de la luz excitatriz con los electrones débilmente asociados de la molécula a excitar, lo que provoca que la energía sea cedida por el campo eléctrico de la luz a la molécula, alterándose la distribución electrónica de la misma.

Muchas son las moléculas que tienen la capacidad de absorber radiación electromagnética UV-visible, sin embargo, son pocas las que tienen la capacidad de fluorecer. El hecho de que una especie molecular flurezca o no para eliminar la energía de excitación depende, sobre todo, de su estructura molecular. La fluorescencia se observa con mayor frecuencia en moléculas orgánicas conjugadas y con un esqueleto molecular parcialmente rígido. Cuanta menos libertad vibracional y

rotacional tenga la molécula, mayor será la posibilidad de que ésta emita fluorescencia.

Hay una gran cantidad de configuraciones ópticas para la detección fluorescente, que difieren básicamente en su funcionamiento. El detector fluorescente básico usado en CE consiste en una fuente de excitación, una celda de detección, un sistema óptico de enfoque de la excitación luminiscente y recolección de la emisión fluorescente y un detector.

Pasaremos a discutir los principales componentes de un detector fluorescente para CE.

Fuentes de excitación

La elección de la fuente de excitación va a influir en la sensibilidad de la detección fluorescente, ya que ésta es proporcional a la intensidad de la luz emitida. La intensidad de luz emitida depende de la eficacia cuántica del soluto fluorescente y del número de moléculas excitadas. Cuantas más moléculas se exciten, más moléculas emitirán luz y por lo tanto se incrementará la señal.

La primera fuente de excitación utilizada en el desarrollo de un detector fluorescente para CE fue una lámpara de arco de mercurio a alta presión⁷⁸.

Con la posterior utilización de los láseres, los detectores de fluorescencia para CE sufrieron una revolución y un gran impulso, debido a que las características de estas fuentes de excitación se acoplan bastante bien a las necesidades instrumentales de esta técnica: elevadas intensidades, estrechas anchuras de banda, coherencia de la señal de salida y facilidad en su focalización en la ventana del capilar.

La Tabla B-3 muestra una relación de fuentes de excitación y sus características técnicas junto con las empresas suministradoras y precio aproximado en euros⁷⁹.

⁷⁸ Jorgenson J.W., Lukacs K.D., *Zone electrophoresis in open-tubular glass capillaries*, Anal. Chem. 226, 1298 (1981).

⁷⁹ Fernández J.F., Gómez A.M., Salinas A., Segura A., *Electroforesis Capilar: aproximación según la técnica de detección*, p. 196 (2005).

TABLA B-3. Fuentes de radiación disponibles para detectores fluorescentes en CE

Fuente de radiación	λ (nm)	P (mW)	Precio (€)	Productor
Láseres UV	262, 266, 349, 351, 355	10-100	14000-24000	CrystaLaser ⁸⁰
Láseres azules	405, 430, 473, 490, 415, 440	5-40	3300-6625	CrystaLaser
Láseres verdes	523, 527, 532	500	1700-6600	CrystaLaser
Láseres rojos	640, 658, 672, 685, 785	200	2500	CrystaLaser
LEDs ultravioletas	350, 365, 370, 375, 380, 382, 385, 393, 395	0.03-8	1.40-55	Roithner ⁸¹
LEDs violetas	400, 405, 410, 423, 430, 435	0.3-12	0.30-9.92	Roithner
LEDs azules	450, 470	1.3-3.5	1.25-4.50	Roithner
LEDs azules-verdes	477, 480, 490, 500, 502, 505, 508	1.2-1.3	1.05-2.70	Roithner
LEDs verdes	525, 565, 570, 572	0.185	1.06-1.97	Roithner
LEDs amarillo-naranjas	588, 590, 591, 600, 605, 610, 615	0.415-1	1.06-2.01	Roithner
LEDs rojos	624, 625, 628, 630, 632, 639, 650, 655, 660, 670, 680, 700, hasta 1500	1.6-6.5	1.06-12.12	Roithner
LDs ultravioletas	375	10	2250	Nichia ⁸²
	375	0.6-1.0		PicoQuant GmbH ⁸³
LDs violetas	410, 440	20-200	1585	Nichia
	400, 405, 440	0.3-3		PicoQuant GmbH
	415	50-200	850-1300	Roithner
LDs azules	473	5		Nichia
	470	0.3-1		PicoQuant GmbH
LDs rojos	635-1550	>5	100	Roithner

Fuentes de excitación láser

Como ya hemos dicho, el número de moléculas excitadas es proporcional a la intensidad de la radiación incidente, por ello, el uso de fuentes láser en el desarrollo de detectores fluorimétricos está muy extendido, obteniendo un modo de detección fluorimétrica denominada fluorescencia inducida por láser (LIF)⁸⁴.

El láser es una fuente de luz con unas características específicas que lo diferencian de otras fuentes lumínicas:

⁸⁰ www.crystalaser.com

⁸¹ www.roithner-laser.com

⁸² www.nichia.com

⁸³ www.pspic.com

⁸⁴ Burton D.E., Sepaniak M.J., Maskarinec M.P., *Analysis of b6 vitamers by micellar electrokinetic capillary chromatography with laser-excited fluorescence detection*, J. Chromatogr. Sci. 24, 347 (1986).

- Monocromatismo: la luz láser contiene una banda muy estrecha de longitudes de onda. Las fuentes de luz convencionales emiten radiación en una banda ancha de longitudes de onda que suele corresponder a todo o parte del espectro UV-vis.
- Coherencia espacial y temporal: la coherencia espacial tiene en cuenta el grado de correlación que existe en la fase de dos puntos del frente de la onda. La coherencia espacial de un láser es mucho mayor que la de cualquier fuente convencional, su origen está en las características peculiares de la emisión estimulada de luz. La coherencia temporal está relacionada con la variación que experimenta la fase en un punto del frente de onda con el transcurso del tiempo, estando ligado a la monocromaticidad de la fuente. Son estas características las que permiten a la luz láser recorrer grandes distancias sin perder intensidad.

A causa de la alta intensidad de la luz incidente y la habilidad de enfocar la luz con precisión en el diámetro interno del capilar, el LIF da lugar a una sensibilidad muy alta, llegando a conseguir límites de detección del orden de 10^{-18} – 10^{-21} mol⁸⁵⁻⁸⁷.

Existe una gran variedad de láseres, entre ellos los de helio-cadmio, ión argón y helio-neón. Los primeros son bastante baratos y emiten a 325 nm y 442 nm. Los de ión argón pueden ser adaptados a distintas longitudes de onda en el verde, azul y el UV (lo más frecuente es entre 350-360, 476, 488 y 514 nm) y están disponibles en distintas potencias, desde unos pocos mW hasta más de 10 W. La acción láser se genera a partir de un único átomo de argón que se excita a partir de una colisión con un electrón. La energía de esta colisión la proporciona una descarga de plasma continua a baja presión y a alta corriente. Esta colisión genera un calor residual considerable

⁸⁵ Drossman H., Luckey J.A., Kostichka A.J., Dcunha J., Smith L.M., *High-speed separations of DNA sequencing reactions by capillary electrophoresis*, Anal. Chem. 62, 900 (1990).

⁸⁶ Liu J.P., Shirota O., Novotny M.V., *Sensitive laser-assisted determination of complex oligosaccharide mixtures separated by capillary gel electrophoresis at high resolution*, Anal. Chem. 64, 973 (1992).

⁸⁷ Swerdlow H., Zhang J.Z., Chen D.Y., Harke H.R., Grey R., Wu S.L., Dovichi N.J., Fuller C., *Three DNA sequencing methods using capillary gel-electrophoresis and laser-induced fluorescence*, Anal. Chem. 63, 2835 (1991).

por lo que es necesario controlar la temperatura. Los láseres de helio-neón funcionan también debido a una descarga de plasma, pero a diferencia de los láseres de argón, la acción láser se genera a través de una colisión atómica. Este proceso genera mucho menos calor residual y, por ello, el conjunto del sistema láser puede ser más pequeño. El láser de He-Ne comparte muchas de las ventajas del láser de argón como son una pequeña divergencia del haz de luz, buena estabilidad y rendimiento de la fuente de energía. Además de estas características, estos láseres son más baratos, son de menor tamaño, y requieren menor control de la temperatura. A pesar de ello, los láseres de He-Ne suelen ser dispositivos con una fuente de baja energía que carecen de una regulación interna de ésta. Por ello son necesarios dispositivos ópticos externos para ajustar la energía que proporciona la fuente al objetivo final⁸⁸.

Los tres criterios principales a la hora de elegir un láser son los siguientes:

- Que la longitud de onda del láser sea lo más cercana posible a la longitud de onda a la que absorbe el soluto a determinar.
- La potencia del láser; mayores potencias dan lugar a mayores intensidades y picos más altos.
- La capacidad del láser para enfocar en un punto concreto muy pequeño; un láser de ión argón puede enfocar a un punto de unos pocos micrómetros, lo que corresponde con el diámetro interno de un capilar.

Las principales desventajas de este tipo de fuentes de excitación son que las longitudes de onda disponibles en los láseres más usuales son limitadas y que los analitos se pueden descomponer debido a la elevada intensidad de la luz incidente, aunque sin duda, las altas sensibilidades que ofrecen compensan con creces todas las desventajas posibles.

⁸⁸ Modlin D.N., Milanovich F.P. en O.T. Wolfbeis (Ed.), *Fiber optic chemical sensors and biosensors*, CRC Press (1991).

Diodos de luz

Los diodos fotoemisivos o LED (light emitting diode), aunque parecen bombillas diminutas son realmente diferentes a éstas, tanto en su fabricación como en la forma en la que producen luz. Son fuentes muy fidedignas de luz que, en función de su configuración, pueden satisfacer diferentes aplicaciones⁸⁹.

Un diodo láser (LD) es un dispositivo semiconductor similar a los LED pero que bajo las condiciones adecuadas emite luz láser. A veces se los denomina diodos láser de inyección.

La primera diferencia entre un diodo LED y un LD se obtiene a partir de las curvas características de potencia luminosa en función de la corriente eléctrica. Otra diferencia es que los LDs producen una emisión en una o unas pocas líneas espectrales, en contraposición a la amplia distribución espectral del LED, y además, los LDs emiten luz coherente.

Las principales ventajas de los LEDs en el desarrollo de detectores fluorescentes para CE son su tamaño, su bajo coste, su estabilidad, su bajo consumo de energía y larga vida (10 o más años)⁹⁰. Las principales desventajas de estos dispositivos son que la producción de luz y el ángulo de visión de estos diodos son limitados en comparación con las otras fuentes de excitación.

El número de métodos de LED-CE ha aumentado considerablemente en los últimos años⁹¹⁻⁹⁴, demostrando las buenas características de esta

⁸⁹ Segura Carretero A., Rodríguez Fernández J., Fernández Sánchez J.F. en Fernández Gutiérrez A., Schulman S.G. (Eds), *Fosforescencia molecular analítica. Una aproximación práctica*, Ed. Univ. Granada (2001).

⁹⁰ Pawliszyn J., *Leds and laser-diodes in schlieren optics methods*, Rev. Sci. Instrum. 58, 245 (1987).

⁹¹ Hillebrand S., Schoffen J.R., Mandaji M., Termignoni C., Grieneisen H.P.H., Kist T.B.L., *Performance of an ultraviolet light-emitting diode-induced fluorescence detector in capillary electrophoresis*, Electrophoresis 23, 2445 (2002).

⁹² Tsai C.H., Huang H.M., Lin C.H., *Violet light emitting diode-induced fluorescence detection combined with on-line sample concentration techniques for use in capillary electrophoresis*, Electrophoresis 24, 3083 (2003).

⁹³ Yu L.J., Yuan L.L., Feng H.T., Li S.F.Y., *Determination of the bacterial pathogen Edwardsiella tarda in fish species by capillary electrophoresis with blue light-emitting diode-induced fluorescence*, Electrophoresis 25, 3139 (2004).

⁹⁴ Huang H.M., Lin C.H., *Methanol plug assisted sweeping-micellar electrokinetic chromatography for the determination of dopamine in urine by violet light emitting diode-induced fluorescence detection*, J. Chromatogr. B 816, 113 (2005).

pequeña y barata fuente de iluminación en el desarrollo de detectores fluorescentes para CE, sin embargo, la utilización de LDs para el mismo fin está todavía incipiente.

Celda de detección

Al igual que en los detectores de absorbancia UV-visible, las celdas de detección más utilizadas para desarrollar detectores de fluorescencia son el propio capilar, en el cual se le abre una ventana mediante la eliminación de la capa de poliimida que lo recubre. Así, la luz excitatriz se enfoca en esta ventana y, simultáneamente, a través de ella se recoge la emisión luminiscente. La disposición de la fuente de excitación y el detector se puede hacer en 90° o en 0°. Este sistema es el más simple, pues no se necesitan conectores capilares y no se perturba la separación electroforética, por lo cual ha sido el más utilizado. La gran desventaja de esta celda on-columna es la aparición de una gran señal de fondo debido a la dispersión de la luz por la curvatura del capilar. Se han propuesto soluciones como usar fibras ópticas con terminación esférica⁹⁵, o el uso de celdas de detección post-columna⁹⁶⁻⁹⁹.

Enfoque y recolección de luz

La función de estos sistemas es hacer incidir sobre la celda de medida la mayor cantidad de luz proveniente de la fuente de excitación y recolectar la mayor fracción de luz proveniente de la emisión fluorescente de los

⁹⁵ Yang B.C., Guan Y.F., *Light-emitting-diode-induced fluorescence detector for capillary electrophoresis using optical fiber with spherical end*, *Talanta* 59, 509 (2003).

⁹⁶ Wu S.L., Dovichi N.J., *High-sensitivity fluorescence detector for fluorescein isothiocyanate derivatives of amino-acids separated by capillary zone electrophoresis*, *J. Chromatogr.* 480, 141 (1989).

⁹⁷ Chen D.Y., Swerdlow H.P., Harke H.R., Zhang J.Z., Dovichi N.J., *Low-cost, high-sensitivity laser-induced fluorescence detection for DNA sequencing by capillary gel-electrophoresis*, *J. Chromatogr.* 559, 237 (1991).

⁹⁸ Swerdlow H., Wu S., Harke H., Dovichi N.J., *Capillary gel-electrophoresis for DNA sequencing – laser-induced fluorescence detection with the sheath flow cuvette*, *J. Chromatogr.* 516, 61 (1990).

⁹⁹ Wu N.A., Huie C.W., *Peroxyoxalate chemiluminescence detection in capillary electrophoresis*, *J. Chromatogr.* 634, 309 (1993).

analitos a determinar, además de seleccionar la longitud de onda de excitación y emisión para eliminar señales de fondo.

Se pueden resumir en dos grandes familias: sistemas de enfoque-recolección de luz y sistemas de selección de longitud de onda.

Los sistemas de enfoque-recolección de luz más empleados son las lentes ópticas y concretamente los objetivos de los microscopios. Pero, tras el amplio crecimiento que han sufrido en los últimos años las fibras ópticas, éstas están reemplazando a las lentes tanto en la focalización de la luz excitatriz en la celda de medida como en la recolección de la emisión luminiscente¹⁰⁰. Sistemas más complejos se están también estudiando como son las lentes cilíndricas y los sistemas de lentes y espejos¹⁰¹.

Sistemas de detección

Los detectores fluorescentes más utilizados en CE son los detectores más desarrollados para los espectrofotómetros luminiscentes convencionales, es decir, fotodiodos¹⁰², fotomultiplicadores¹⁰³, y detectores multicanal (fotodiodos en serie y dispositivos de transferencia de carga – CCDs)¹⁰⁴. Estos últimos permiten el desarrollo de métodos multidimensionales de detección fluorescente tanto de medida simultánea de más de una longitud de onda como de métodos multicapilares.

¹⁰⁰ Pentoney S.L., Sweedler J.V. en J.P. Landers (Ed.), *Handbook of capillary electrophoresis*, CRC Press, New York (1997).

¹⁰¹ Sweedler J.V., Shear J.B., Fishman H.A., Zare R.N., Séller R.H., *Fluorescence detection in capillary zone electrophoresis using a charge-coupled device with time-delayed integration*, *Anal. Chem.* 63, 496 (1991).

¹⁰² Kulmala S., Suomi J., *Current status of modern analytical luminescence methods*, *Anal. Chim. Acta* 500, 21 (2003).

¹⁰³ Swinney K., Bornhop D.J., *Detection in capillary electrophoresis*, *Electrophoresis* 21, 1239 (2000).

¹⁰⁴ Zhou Z., Wang K.M., Yang X.H., Huang S.S., Zhou L.J., Quin D.L., Du L., *Synchronization of separation and determination based on multichannel mode-filtered light detection with capillary electrophoresis*, *Analyst* 126, 1838 (2001).

5.2.2. Modos de detección

Los modos de detección fluorescentes en CE pueden ser directos (detección de fluorescencia nativa¹⁰⁵⁻¹⁰⁹ o detección tras derivatización fluorescente¹¹⁰) o indirectos.

Aproximadamente sólo el 10% de los compuestos orgánicos poseen una eficiencia cuántica lo suficientemente grande como para poder ser detectados por fluorescencia directa. Por ello, en el pasado, los trabajos en los que se combinaba la CE y la fluorescencia estaban muy limitados.

Dentro de los métodos de derivatización fluorescente se pueden distinguir diferentes estrategias de derivatización: pre-columna, en-línea, on-columna y post-columna.

Los reactivos derivatizantes más usados han sido: cloruro de dansilo, ácido benzoico, fluorescamina, o-ftalaldehído (OPA), naftalen-2,3-dicarboxaldehído (NDA), fluoresceína isotiocianato (FITC), 3-(4-carboxibenzoil)-2-quinolin-carboxaldehído (CBQCA), nitrobenzoxadiazol (NBD) y 9-fluoroenilmetil cloroformato (FMOC).

La gran mayoría de los métodos son métodos FIL-CE¹¹¹⁻¹¹⁷, aunque hay algunos en los que se usa un LED como fuente de excitación.

¹⁰⁵ Swinney K, Bornhop D., *A review of CE detection methodologies*, Crit. Rev. Anal. Chem. 30,1 (2000).

¹⁰⁶ Gooijer C., Kok S.J., Ariese F., *Capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection for natively fluorescent analytes*, Analisis 28, 679 (2000).

¹⁰⁷ Paez X., Hernández L., *Biomedical applications of capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection*, Biopharm. Drug Dispos. 22, 273 (2001).

¹⁰⁸ Schulze P., Ludwig M., Kohler F., Belder D., *Deep UV laser-induced fluorescence detection of unlabeled drugs and proteins in microchip electrophoresis*, Anal. Chem. 77, 1325 (2005).

¹⁰⁹ Arráez-Román D., Fernández-Sánchez J.F., Cortacero-Ramírez S., Segura-Carretero A., Fernández-Gutiérrez A., *A simple light-emitted diode-induced fluorescence detector using optical fibers and a charged coupled device for direct and indirect capillary electrophoresis methods*, Electrophoresis 27, 1776 (2006).

¹¹⁰ Cortacero-Ramírez, Arráez-Román, Segura-Carretero, Fernández-Gutiérrez, *Determination of biogenic amines in beers and brewing-process samples by capillary electrophoresis coupled to laser-induced fluorescence detection*, Food Chemistry 100, 383 (2007).

¹¹¹ Dolnik V., Hutterer K.M., *Capillary electrophoresis of proteins 1999-2001*, Electrophoresis 22, 4163 (2001).

¹¹² Poinsof V., Bayle C., Couderc F., *Recent advances in amino acid analysis by capillary electrophoresis*, Electrophoresis 24, 4047 (2003).

¹¹³ Sandberg M., Weber S.G., *Techniques for neuropeptide determination*, Trac-Trends Anal. Chem. 22, 522 (2003).

La determinación indirecta se usa para moléculas que no posean fluorescencia. Se añade un fluoróforo al tampón de separación de forma que llega continuamente señal fluorescente al detector, excepto cuando la molécula no fluorescente llega al detector. De esta forma se obtienen picos negativos en el electroferograma^{109,118-124}.

5.3. Espectrometría de masas

El acoplamiento entre la CE como técnica analítica de separación y el espectrometría de masas como sistema de detección (CE-MS) ha despertado un gran interés en los últimos años. El acoplamiento de un detector tan selectivo como MS a una técnica tan versátil y que proporciona eficacias tan elevadas como CE da como resultado una herramienta muy potente de análisis; se combinan así la rapidez del análisis, el alto poder de resolución y un consumo muy pequeño de muestra, proporcionados por la CE, con la selectividad del análisis y la información

114 Bayle C., Siri N., Poinsov V., Treilhou M., Causse E., Couderc F., *Analysis of tryptophan and tyrosine in cerebrospinal fluid by capillary electrophoresis and "ball lens" UV-pulsed laser-induced fluorescence detection*, J. Chromatogr. A 1013, 123 (2003).

115 Wirtz M., Stach D., Kliem H.C., Wiessler M., Schmitz O.J., *Determination of the DNA methylation level in tumor cells by capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence detection*, Electrophoresis 25, 839 (2004).

116 Zhang H., Jin W.R., *Analysis of amino acids in individual human erythrocytes by capillary electrophoresis with electroporation for intracellular derivatization and laser-induced fluorescence detection*, Electrophoresis 25, 480 (2004).

117 Arráez-Román D., Segura-Carretero A., Cruces-Blanco C., Fernández-Gutiérrez A., *Subminute and sensitive determination of the neurotransmitter serotonin in urine by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection*, Biomed. Chromatogr. 18, 422 (2004).

118 Huang M.F., Chang H.T., *Indirect fluorescence of amines in capillary electrophoresis using cresyl violet*, J. Liq. Chromatogr. & Rel. Tech. 26, 3387 (2003).

119 Melanson J.E., Boulet C.A., Lucy C.A., *Indirect laser-induced fluorescence detection for capillary electrophoresis using a violet diode laser*, Anal. Chem. 73, 1809 (2001).

120 Ragozina N., Putz M., Faubel W., Pyell U., *Indirect laser-induced fluorescence detection for capillary electrophoresis using a frequency-doubled diode laser*, Electrophoresis 24, 567 (2003).

121 Chiu T.C., Huang M.F., Huang C.C., Hsieh M.M., Chang H.T., *Indirect fluorescence of aliphatic carboxylic acids in nonaqueous capillary electrophoresis using merocyanine 540*, Electrophoresis 23, 449 (2002).

122 Wallenborg S.R., Bailey C.G., *Separation and detection of explosives on a microchip using micellar electrokinetic chromatography and indirect laser-induced fluorescence*, Anal. Chem. 72, 1872 (2000).

123 Chen S.J., Chen M.J., Chang H.T., *Light-emitting diode-based indirect fluorescence detection for simultaneous determination of anions and cations in capillary electrophoresis*, J. Chromatogr. A 1017, 215 (2003).

124 Chen S.J., Chen M.J., Chang H.T., *Light-emitting diode-based indirect fluorescence detection for simultaneous determination of anions and cations in capillary electrophoresis*, J. Chromatogr. A 1017, 215 (2003).

estructural que proporciona la MS. Una de las ventajas del acoplamiento de la MS a cualquier técnica separativa es que proporciona una segunda dimensión de separación; en concreto, acoplada a la CE, además de la separación de los analitos según su relación carga/tamaño (en la modalidad CZE) se añade la separación en función de su relación masa/carga¹²⁵.

Su importancia queda probada cuando observamos el gran número de artículos, libros, *reviews* describiendo aplicaciones que se han publicado recientemente¹²⁶⁻¹³¹. Es alentador ver que la naturaleza de los compuestos que se analizan mediante CE-MS se hace cada vez más extensa y variada y logra barrer un rango más amplio.

5.3.1. Principios e instrumentación

El esquema de lo que sería el acoplamiento CE-MS (o cualquier otra técnica separativa) sería el mostrado en la Figura B-4.

¹²⁵ Hernández Borges J., Simó C., Cifuentes A., *Principios de Electroforesis Capilar-Espectrometría de Masas: aplicación al análisis de pesticidas*, Cromatografía y Técnicas afines 24, 45 (2003).

¹²⁶ Schmitt-Kopplin P., Frommberger M., *Capillary electrophoresis-mass spectrometry: 15 years of developments and applications*, Electrophoresis 24, 3837 (2003).

¹²⁷ Severs J.C., Smith R.D., *Electrospray ionisation mass spectrometry*, Ed. John Wiley & Sons, New York (1997).

¹²⁸ Banks J.F., *Recent advances in capillary electrophoresis/electrospray/mass spectrometry*, Electrophoresis 18, 2255 (1997).

¹²⁹ Tomer K.B., Deterding L.J., Parker C.E., *High performance capillary electrophoresis. Theory, techniques and applications*, Ed. John Wiley & Sons, New York (1998).

¹³⁰ Huck C.W., Bakry R., Bonn G.K., *Progress in capillary electrophoresis of biomarkers and metabolites between 2002 and 2005*, Electrophoresis 27, 111 (2006).

¹³¹ Smyth W.F., *Recent applications of capillary electrophoresis-electrospray ionisation-mass spectrometry in drug analysis*, Electrophoresis 27, 2051 (2006).

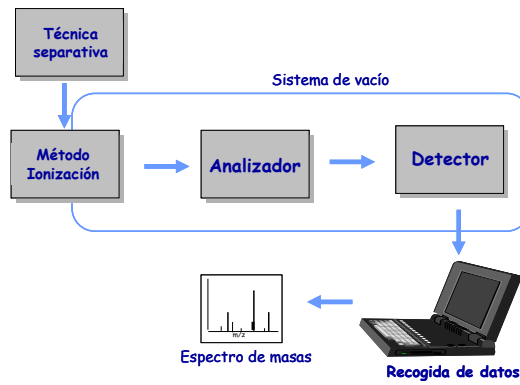


FIGURA B-4. Esquema del acoplamiento entre una técnica separativa y MS

Al inicio del esquema se coloca la técnica separativa, seguida de la interfase, en la cual se produce la ionización de los analitos. Después los iones en fase gaseosa son transportados al analizador de masas y una vez analizados se detectan, registran y procesan los datos a través de un sistema informático.

Tanto el método de ionización como el analizador pueden ser de varios tipos, como se esquematiza en la Figura B-5.

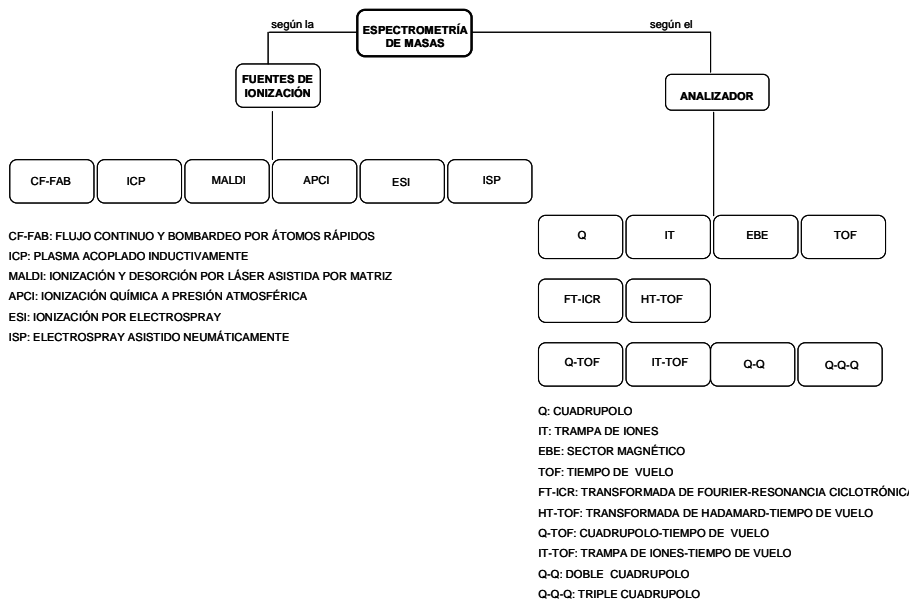


FIGURA B-5. Posibles fuentes de ionización y analizadores empleados en el acoplamiento entre una técnica separativa y MS

Para poder acoplar CE con MS se han de solventar varias dificultades. La primera viene derivada de que la CE es una técnica que trabaja en fase líquida, y de que en un espectrómetro de masas las sustancias deben entrar en fase gas para poder ser analizadas. Esto obliga a la utilización de una adecuada interfase. Además, el acoplamiento debe hacer frente a otra segunda adversidad como es el cierre del circuito eléctrico en el que trabaja el instrumento de CE.

Se han descrito diversas interfases¹³², entre ellas la de flujo continuo y bombardeo con átomos rápidos (CF-FAB)¹³³; la de ionización y desorción por láser asistida por una matriz (MALDI)¹³⁴, que se utiliza principalmente en acoplamientos CE-MS *off-line*; la de ionización química a presión atmosférica (APCI)¹³⁵; el plasma de acoplamiento inductivo (ICP)¹³⁶, fundamentalmente usado para átomos metálicos y algunos no metálicos; la ionización por electrospray o electronebulización (ESI)¹³⁷; el electrospray asistido neumáticamente (ISP), etc.

En la Figura B-6 se muestra una comparativa entre los sistemas de ionización que han sido más utilizados en el acoplamiento CE-MS, teniendo en cuenta la polaridad y el peso molecular de los analitos en estudio.

¹³² Gelpi E., *Interfaces for coupled liquid-phase separation/mass spectrometry techniques. An update on recent developments*, J. Mass Spectrom. 37, 241 (2002).

¹³³ Moseley M.A., Deterding L.J., Tomer K.B., Jorgenson J.B., *Capillary-zone electrophoresis/fast atom bombardment mass spectrometry: design of an online coaxial continuous-flow interface*, Rapid Commun. Mass Spectrom. 3, 87 (1989).

¹³⁴ Preisler J., Hu P., Rejtar T., Karger B.L., *Capillary electrophoresis-matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry using a vacuum deposition interface*, Anal. Chem. 72, 4785 (2000).

¹³⁵ Tanaka Y., Otsuka K., Terabe S., *Evaluation of an atmospheric pressure chemical, ionization interface for capillary electrophoresis-mass spectrometry*, J. Pharm. Biomed. Anal. 30, 1889 (2003).

¹³⁶ Montes-Bayon M., Profrock D., Sanz-Medel A., Prange A., *Direct comparison of capillary electrophoresis and capillary liquid chromatography hyphenated to collision cell inductively coupled plasma mass spectrometry for the investigation of Cd-, Cu-, and Zn-containing metalloproteins*, J. Chromatogr. A 1114, 138 (2006).

¹³⁷ Loo J.A., Loo R.R.O., Light K.J., Edmonds C.G., Smith R.D., *Multiply charged negative-ions by electrospray ionisation of polypeptides and proteins*, Anal. Chem. 64, 81 (1992).

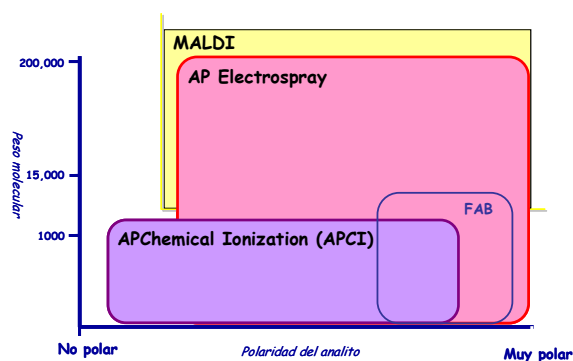


FIGURA B-6. Rango de trabajo de los sistemas de ionización más comunes (AP: presión atmosférica)

A pesar de la variedad de interfases desarrolladas para el acoplamiento CE-MS, la más utilizada actualmente es la interfase ESI. Esta interfase además de permitir la transferencia directa de los compuestos desde el capilar de separación hasta el espectrómetro de masas, permite un análisis eficaz de compuestos polares, lábiles y/o de compuestos con un alto peso molecular (normalmente hasta 100000 Da). Por otro lado, es fácil de implementar, es sensible y puede usarse en un amplio intervalo de aplicaciones.

5.3.2. Ionización por electro spray (ESI)

Fueron Dole y col.¹³⁸ al final de la década de 1960 quienes describieron el primer uso analítico del electro spray, y alrededor de 1980, Fenn y col.¹³⁹ llevaron a cabo el principal desarrollo de la técnica ESI para su uso con espectrometría de masas, lo que le valió a este último la obtención del Premio Nobel.

En ocasiones no se considera el ESI como un procedimiento de ionización en sí, ya que no produce iones, sino la transferencia de éstos desde una fase líquida a una fase gaseosa; sin embargo, de lo que no hay duda es de que tiene el potencial suficiente para, a través de colisiones ión-molécula, producir cambios en la naturaleza y carga de los iones en fase gas.

¹³⁸ Dole M., Mack L.L., *Molecular beams of macroions*, J. Chem. Phys. 49, 2240 (1968).

¹³⁹ Yamashita M., Fenn J.B., *Electrospray ion-source. Another variation on the free-jet theme*, J. Phys. Chem. 88, 4451 (1984).

En el proceso de formación del electrospray, que se lleva a cabo a presión atmosférica, intervienen diversos mecanismos al mismo tiempo (Figura B-7). La muestra, procedente del capilar de separación, y con la ayuda de un gas nebulizador, se carga y dispersa simultáneamente. El disolvente se va evaporando (desolvatación) de las microgotas formadas y éstas van aumentando su densidad de carga eléctrica. Como consecuencia, las gotas se encogen y los iones que se encuentran en la superficie se ven forzados a aproximarse entre sí debido al campo electrostático que se aplica entre la salida del capilar y la entrada al equipo MS ($\pm 2-5$ kV). En cierto momento, la repulsión de los iones se hace mayor que la tensión de la superficie que mantiene unidas las gotas en forma esférica, y las pequeñas gotas se rompen (el punto donde se pronostica que las gotas se romperán se llama límite de Rayleigh, pero la ruptura se suele producir un poco antes de que se alcance dicho punto). Debido a fuerzas de repulsión coulómbica aumenta la tensión superficial de las microgotas y éstas acaban "explotando" ("explosiones de Coulomb"), formándose así una serie de pequeñas gotas cargadas que seguirán sufriendo procesos de evaporación y explosión sucesivos hasta que finalmente se forman iones cargados desnudos que pasan a fase gaseosa con una o más cargas y son atraídos hacia la entrada del espectrómetro de masas como consecuencia del voltaje aplicado^{140,141}.

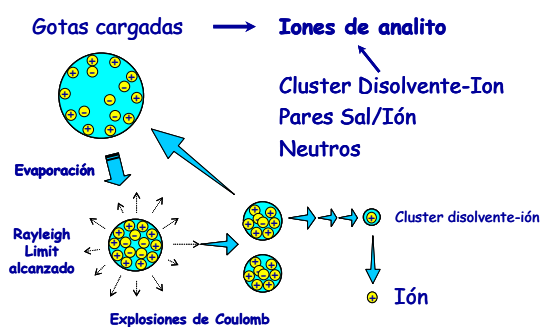


FIGURA B-7. Proceso de formación del electrospray

¹⁴⁰ Simó C., Cifuentes A., *Electroforesis Capilar: aproximación según la técnica de detección*, Ed. Univ. Granada, pp 409-438 (2005).

¹⁴¹ Martín Smith R., *Understanding Mass Spectra. A basic approach*, John Wiley & Sons, Inc., pp 1-40 (1999).

El hecho de que en el proceso de ionización se puedan formar iones mono- o multicargados, es una de las características que ha hecho que esta técnica haya revolucionado el campo de los acoplamientos entre técnicas analíticas de separación que trabajan en fase líquida y la espectrometría de masas. Un incremento en el número de cargas en una molécula disminuirá el valor de su relación masa/carga (m/z), que es el parámetro utilizado para el análisis por un espectrómetro de masas. De este modo, mediante la detección de iones multicargados, se va a poder detectar compuestos con pesos moleculares muy altos empleando analizadores de masas que trabajan con un intervalo limitado de valores m/z .

La ionización se puede llevar a cabo en el modo positivo o negativo. En el modo positivo, se podrán formar iones múltiplemente protonados $[M+nH]^{n+}$ donde n es el número de protones cargados positivamente en la molécula. Del mismo modo, es posible también la formación de aductos con iones sodio, litio, potasio, amonio, etc. En el modo negativo, se observa normalmente la desprotonación de las moléculas, pudiéndose formar también iones múltiplemente desprotonados $[M-nH]^{n-}$.

5.3.2.1. Interfases para el acoplamiento EC-ESI-MS

Como se adelantaba antes, en el acoplamiento CE-ESI-MS, el primer problema que se plantea es la incompatibilidad del flujo procedente del capilar de separación (de hasta 100 nl/min), con el flujo necesario para la formación de un electrospray estable (1-200 μ l/min). Para solucionar este problema se han propuesto dos estrategias: el uso de un flujo adicional y el uso de las llamadas interfases micro- o nano-ESI, con las cuales se va a poder trabajar con flujos extremadamente pequeños.

El segundo problema es mantener el circuito eléctrico que se requiere para llevar a cabo la separación en CE y que se forma entre los extremos del capilar al aplicar la diferencia de potencial. Otro problema que aparece en el acoplamiento CE-ESI-MS es la compatibilidad de los diferentes modos de CE con el espectrómetro de masas, ya que

dependiendo del modo de CE, se va a requerir o no el empleo de sustancias poco compatibles con ESI (iones borato, fosfato, detergentes para la formación de micelas, ciclodextrinas, etc.), las cuales por su escasa volatilidad contribuyen de forma significativa al incremento del ruido de fondo en la detección por MS, arruinando la sensibilidad y llegando a obstruir y/o contaminar en ciertos casos el sistema de detección.

Todas las dificultades indicadas del acoplamiento CE-MS han hecho que se hayan desarrollado diversos tipos de interfases para CE-ESI-MS¹⁴²⁻¹⁴⁷ teniendo como objetivo la formación de un electrospray estable y el mantenimiento de la corriente eléctrica en el interior del capilar. Con esta idea se han desarrollado fundamentalmente tres tipos de interfases ESI: sin flujo adicional, con flujo adicional y con unión líquida. En la Tabla B-4 se muestra de forma resumida las principales características de todas ellas.

¹⁴² Chao B.F., Chen C.J., Li F.A., Her G.R., *Sheathless capillary electrophoresis-mass spectrometry using a pulsed electrospray ionisation source*, *Electrophoresis* 27, 2083 (2006).

¹⁴³ Huhn C., Neuss C., Pelzing M., Pyell U., Mannhardt J., Putz M., *Capillary electrophoresis-laser induced fluorescence-electrospray ionisation-mass spectrometry: a case study*, *Electrophoresis* 26, 1389 (2005).

¹⁴⁴ Zamfir A.D., Dinca N., Sisu E., Peter-Katalinic L., *Copper-coated microsyringe interface for on-line sheathless capillary electrophoresis electrospray mass spectrometry of carbohydrates*, *J. Sep. Sci.* 29, 414 (2006).

¹⁴⁵ Ding J.M., Vouros P., *Advances in CE/MS. Recent developments in interfaces and applications*, *Analytical Chemistry News & Features* 71, 378A (1999).

¹⁴⁶ Cai J.Y., Henion J., *Capillary electrophoresis-mass spectrometry*, *J. Chromatogr. A* 703, 667 (1995).

¹⁴⁷ Figeys D., Aebersold R., *High sensitivity analysis of proteins and peptides by capillary electrophoresis tandem mass spectrometry: recent developments in technology and applications*, *Electrophoresis* 19, 885 (1998).

TABLA B-4. Principales características de los tres tipos de interfases ESI más utilizadas

Interfase	Contacto eléctrico	Spray	Ventajas	Inconvenientes
Sin flujo adicional	*Recubrimiento conductor *Electrodo en el interior del capilar	Del capilar de separación (0-100 nl/min, nano-ESI)	Alta sensibilidad	*No muy estable (recubrimiento inestable, obstrucción...) *Dependiente del EOF
Con flujo adicional	Líquido adicional	Líquido adicional (1-6 µl/min)	*Disponibilidad comercial *Independiente del EOF *Spray estable	Baja sensibilidad
Unión líquida	Depósito con electrolito de separación entre capilar de separación y el de transferencia	Del capilar de transferencia (nano-ESI)	*Alta sensibilidad *Independiente del EOF *Más estable que ESI sin flujo adicional	*Ensanchamiento de los picos *Menos estable que ESI con flujo adicional (obstrucción del capilar de transferencia...)

Pasaremos a explicar en más detalle la interfase **ESI con flujo adicional**, que ha sido la empleada en el acoplamiento CE-MS en esta memoria.

Esta interfase está formada por tres tubos concéntricos (Figura B-8), el primero de ellos es el propio capilar de separación que se encuentra rodeado de un tubo de acero inoxidable por el que se hace fluir el líquido adicional, y por un tercer tubo por el cual se introduce un gas nebulizador que favorece la formación del electro spray.

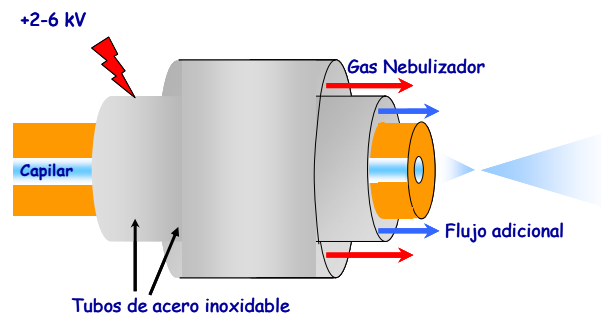


FIGURA B-8. Esquema de una interfase ESI con flujo adicional

Como se ha comentado anteriormente, para que una interfase ESI trabaje de modo estable requiere flujos del orden de ml/min, de modo que el flujo con el que típicamente se trabaja en CE (del orden de los nl/min) se

aumenta mediante el empleo del líquido adicional, facilitando el acoplamiento CE-MS y dando lugar a la formación de un electrospray estable. Además, el flujo adicional facilita el cierre del circuito eléctrico con el interior del capilar, ya que el líquido añadido permite el contacto entre el electrolito de separación que fluye del interior del capilar y el tubo metálico (conectado a tierra) que rodea el capilar de separación.

Se trata de una interfase robusta y de fácil manejo, aunque presenta algunas limitaciones, como por ejemplo la disminución de la sensibilidad resultante de la dilución que el líquido adicional produce sobre las bandas de los analitos que salen del capilar. Por otro lado, es necesario considerar otros parámetros como son la composición y el flujo de la disolución adicional¹⁴⁸, presión del gas nebulizador, situación del capilar con respecto al tubo concéntrico que lo rodea¹⁴⁹, naturaleza del electrolito de separación, etc, ya que van a influir tanto sobre la intensidad de la señal MS como sobre la resolución de la separación^{150,151}.

En líneas generales, se pueden dar las siguientes recomendaciones experimentales para llevar a cabo con éxito el acoplamiento CE-MS con interfase ESI de flujo adicional:

1. El capilar debe sobresalir con respecto al tubo concéntrico que lo rodea aproximadamente un tercio de su diámetro externo (p.ej., un capilar típico de 360 µm de diámetro externo deberá sobresalir aproximadamente 120 µm).

2. El flujo adicional debe ser suficientemente conductor como para cerrar el circuito eléctrico con el interior del capilar de separación, pero con una fuerza iónica no demasiado alta para evitar descargas en la fuente de ionización.

¹⁴⁸ Zheng J., Jann M.W., Hon Y.Y., Shamsi S.A., *Development of capillary zone electrophoresis-electrospray ionisation-mass spectrometry for the determination of lamotrigine in human plasma*, *Electrophoresis* 25,2033 (2004).

¹⁴⁹ Geiser L., Rudaz S., Veuthey J.L., *Validation of capillary electrophoresis-mass spectrometry methods for the analysis of a pharmaceutical formulation*, *Electrophoresis* 24, 3049 (2003).

¹⁵⁰ Samskog J., Wetterhall M., Jacobsson S., Markides K., *Optimization of capillary electrophoresis conditions for coupling to a mass spectrometer via a sheathless interface*, *J. Mass Spectrometry* 35, 919 (2000).

¹⁵¹ Huikko K., Kotiaho T., Kostianen R., *Effects of nebulizing and drying gas flow on capillary electrophoresis/mass spectrometry*, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 16, 1562 (2002).

3. Normalmente el flujo adicional debe contener un porcentaje alto de disolvente orgánico, y una pequeña cantidad de ácido o base para mejorar la ionización de las sustancias en estudio, según se trabaje con ESI en modo positivo o negativo.

4. Los flujos de líquido adicional y de gas nebulizador deben mantenerse en valores suficientemente bajos como para permitir un electrospray estable, evitando la generación del efecto de succión o excesiva dilución de los analitos.

Lógicamente, estas son recomendaciones muy generales; determinadas aplicaciones pueden utilizar valores experimentales muy diferentes.

A pesar de las limitaciones e inconvenientes de esta interfase, actualmente es la más utilizada en el acoplamiento CE-MS.

5.3.3. Analizadores de masas

Una vez que la interfase se ha llevado a cabo la transferencia de iones procedentes del capilar desde la fase líquida a la fase gaseosa, los iones son dirigidos al analizador de masas.

Los analizadores de masas permiten la separación, detección y cuantificación de los analitos en estudio con un grado de sensibilidad y selectividad muy elevado, proporcionando información sobre su masa molecular.

En los acoplamientos CE-MS se han utilizado todo tipo de analizadores, como cuadrupolos (Q), trampa de iones (IT), sectores magnéticos (EBE), analizadores de tiempo de vuelo (TOF), e incluso los sistemas más complejos como los analizadores de Transformada de Fourier-Resonancia Ciclotrónica (FT-ICR), analizadores de Transformada de Hadamard-TOF (HF-TOF), y los formados por combinación de los anteriores, como por ejemplo analizadores Q-TOF, IT-TOF o triple cuadrupolo (QqQ)¹⁵² (Figura B-8).

¹⁵² Simó C., Cifuentes A., *Análisis and Detection by Capillary Electrophoresis*, Elsevier, pp 441-517 (2005).

En el acoplamiento llevado a cabo entre CE y MS en el trabajo experimental desarrollado en esta memoria, ha sido utilizado el analizador TOF, pasaremos a describir en mayor detalle el mismo.

El analizador de **Tiempo de vuelo (TOF)** separa masas sin un campo magnético. La manera en que TOF discrimina es obteniendo ventajas de las diferentes velocidades de los iones acelerados mediante un mismo potencial. Si los iones de masa diferente se aceleran a través del potencial y entonces se les permite pasar a través de un tubo de alto vacío con una determinada longitud, no todos llegarán al extremo contrario a la vez. Es decir, se diferencian los iones basándose en la distinta velocidad que adquieren en el interior del analizador en función de su relación m/z . En primer lugar, los iones son extraídos de la cámara de ionización y acelerados hacia el tubo de vuelo mediante un campo electrostático que les aporta una elevada energía cinética. Los iones de mayor m/z "volarán" a menor velocidad que los de menor m/z . La resolución entre los iones de diferente m/z será mejor cuanto mayor sea la longitud del tubo (habrá mayor separación de los iones en el tiempo) y cuanto menor sea la dispersión en energías de los iones formados en la fuente¹⁵³.

En la actualidad se están reemplazando los espectrómetros TOF de trayectoria directa por aquellos que provocan la reflexión de los iones empleando un espejo de iones. Este instrumental recibe el nombre de TOF reflexivo¹⁵³.

En la Figura B-9 pueden verse las partes del MicroTOF empleado en el trabajo experimental de esta memoria. Así, vamos encontrando la cámara de formación del spray (spray chamber), la unidad de desolvatación (desolvation unit), la zona de "guía y convergencia" de iones (ion guide and beam focusing), la zona de aceleración ortogonal (orthogonal acceleration), el detector de referencia, el camino o tubo de vuelo (flight path), el reflector (reflector) y el detector (detector). Cuatro de los compartimentos han de estar sometidos a algo vacío.

¹⁵³ Rubinson K.A., Rubinson J.F., *Análisis Instrumental*, Ed. Pearson Education S.A. Madrid, pp522-577 (2000).

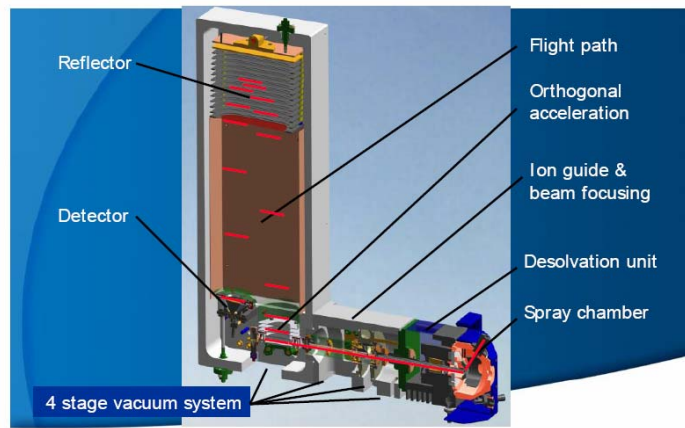


FIGURA B-9. Esquema del interior de un MicroTOF de Bruker Daltonics

Para ver qué sucede en cada una de las partes del MicroTOF se muestra un esquema más detallado en la Figura B-10.

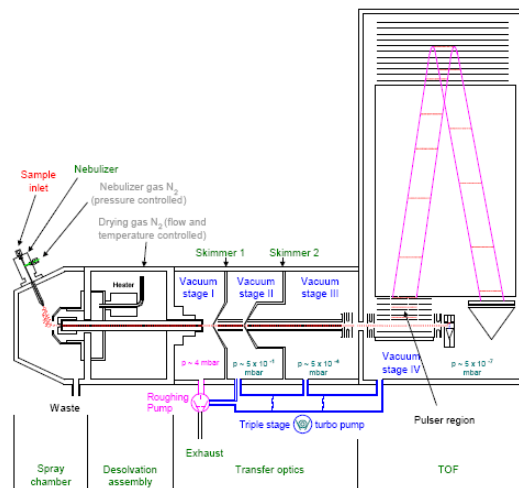


FIGURA B-10. Esquema detallado de las partes de la que consta un ESI-MicroTOF

En la primera parte del esquema, la cámara de formación de spray inicia la formación del electrospray dependiendo de la interfase empleada. La unidad de desolvatación separa las zonas que se encuentran a presión atmosférica de la primera zona de alto vacío, y consta de un calentador del gas de secado y un capilar de cristal. Se llega a través de ella al módulo de transmisión o transferencia óptica que consta de tres módulos que están a alto vacío.

El primero de ellos (stage I) es el único que está conectado a una bomba externa rotatoria; mientras que los tres módulos (stages I, II y III) están conectados a una bomba turbo molecular que posee diferentes niveles de vacío. Están separados entre sí por varios skimmers. Los dos hexapolos son los que transfieren los iones hasta la zona de alto vacío, mientras que las lentes enfocan o dirigen dichos iones.

La zona de aceleración ortogonal contiene dos de las últimas lentes mencionadas anteriormente y acelera los iones para medir el tiempo de vuelo.

En función de su masa los iones se introducen en mayor o menor medida en el reflector (Figura B-11). Detrás del mismo hay zonas de tensión que repelen los iones que le llegan, lógicamente se repelen los iones pequeños con más facilidad. Así mismo, cada ión será repelido con distinto ángulo, aunque sea cual sea el ángulo, el ión incidirá en el detector.

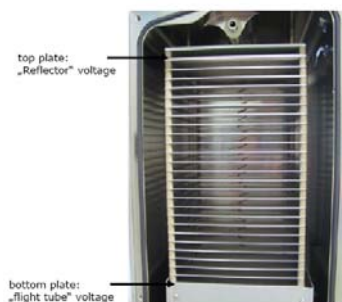


FIGURA B-11. Imagen de la parte final del tubo de vuelo donde se sitúa el reflector

El detector es un detector de impacto electrónico que consiste en una serie de placas a alto voltaje que convierten el impacto de los iones en señales eléctricas. También hay un detector de referencia.

En el detector hay millones de poros muy pequeños que están internamente recubiertos con una capa semiconductor; cada uno de ellos

trabaja como un multiplicador de electrones independiente. El diámetro aproximado del área activa del detector es de 25 mm.

6. Desarrollo de un método electroforético

El desarrollo de los métodos electroforéticos se pueden llevar a cabo mediante optimización de tipo uni- o multivariante. En el primero de los casos, en cada uno de los pasos se fijarán todas las variables excepto una, cuya influencia se estudia en dicha etapa de la optimización. El éxito de este tipo de optimización dependerá en gran medida de la profundidad y rigor con que se hayan realizado los estudios preliminares.

En el segundo tipo de optimización, sin embargo, las etapas experimentales se verán bastante reducidas, ya que se habrán programado unas cuantas experiencias que nos permitan estudiar la influencia de varias variables simultáneamente.

En los métodos electroforéticos puestos a punto en esta tesis doctoral, se utilizó la optimización univariante en todos los casos, siguiéndose las etapas que a continuación se describen^{7,154-156}:

6.1. Selección del capilar

Cuanto más largo sea un capilar, mayor es el tiempo de análisis y mayor la separación o resolución entre picos. Por otra parte, la sensibilidad de un método depende en gran medida del diámetro interno del capilar.

Un capilar de diámetro interno de 50-75 μm es muy aconsejable para llevar a cabo un gran número de separaciones evitando los problemas debidos a la excesiva generación de corriente. Para obtener la máxima sensibilidad

¹⁵⁴ McLaughlin G.M., Weston A., Hauffe K.D., *Capillary electrophoresis methods development and sensitivity enhancement strategies for the separation of industrial and environmental chemicals*, J. Chromatogr. A 744, 123 (1996).

¹⁵⁵ Morris V.M., Hargreaves C., Overall K., Marriott P.J., Hughes J.G., *Optimization of the capillary electrophoresis separation of ranitidine and related compounds*, J. Chromatogr. A 766, 245 (1997).

¹⁵⁶ Dolnik V., *Selectivity, differential mobility and resolution as parameters to optimize capillary electrophoretic separation*, J. Chromatogr. A, 744, 115 (1996).

posible se pueden utilizar capilares de 100 μm de diámetro interno, aunque en este caso se debe reducir el voltaje y/o la concentración de la disolución de separación ya que los problemas de calentamiento interno aumentan con el diámetro del capilar.

6.2. Voltaje y corriente

La fuerza del campo eléctrico aplicada al capilar es el motor de la separación. Tanto la velocidad electroforética como la electroosmótica son directamente proporcionales al campo eléctrico, por lo que un aumento del voltaje aplicado proporcionará mayor rapidez al análisis. La conducción de la corriente eléctrica a través de una disolución genera calor debido a las colisiones entre iones. Si el calor no se disipa, la temperatura dentro del capilar aumenta y podrían aparecer burbujas dentro del capilar que podrían interrumpir el paso de corriente. La producción de calor a altos voltajes es la mayor limitación a un aumento del potencial, ya que el efecto Joule contribuye significativamente a la dispersión de los analitos y, por tanto, al solapamiento de los picos.

6.3. Disolución de separación

Las características de la disolución de separación (pH, capacidad reguladora, fuerza iónica, aditivos, etc.) juegan un papel decisivo en la separación electroforética.

6.3.1. pH

El pH es una variable de gran repercusión en la selectividad de los métodos electroforéticos pues influye en la carga neta de especies ácidas o básicas débiles que migran electroforéticamente. La selección de una disolución de análisis depende del pH requerido para la separación de los analitos. Teóricamente a medida que aumenta el pH aumenta la movilidad electroosmótica. En primer lugar, porque elevados valores de pH producen

más disociación de los grupos silanoles Si-OH a Si-O⁻ dentro de las paredes del capilar. Por otro lado, el potencial zeta es proporcional a la carga de la superficie de las paredes internas del capilar, por lo que a medida que aumenta el pH, aumenta el potencial zeta y consecuentemente la velocidad electroosmótica.

6.3.2. Capacidad reguladora y composición

La capacidad reguladora debe ser alta sin un aumento excesivo de la conductividad, en una zona lo más amplia posible de pH, para que se obtenga buena reproducibilidad y una baja fuerza iónica para minimizar el efecto Joule. La capacidad reguladora disminuye 10 veces por cada unidad de pH que se desplace de su máximo ($\text{pH}=\text{pK}_a$). La capacidad reguladora de un anfolito en la zona de pH cercana a su pI depende de la magnitud de la diferencia $\text{pI}-\text{pK}_1$, cuando esta diferencia es superior a 2.5 el anfolito no puede usarse como disolución reguladora.

6.3.3. Fuerza iónica

La fuerza iónica de la disolución de separación es una variable de importancia similar al pH si se tiene en cuenta su impacto en la eficacia, resolución y sensibilidad de la CE, ya que tiene una influencia decisiva en las movilidades electroforéticas y electroosmóticas. Normalmente, se puede afirmar que, al aumentar la concentración de la disolución de separación (es decir la fuerza iónica), se mejora la resolución de los analitos y su forma. Sin embargo se genera más calor dentro del capilar y es necesario un buen sistema para regular la temperatura. El uso de capilares de pequeño diámetro permite aumentar la fuerza iónica de la disolución reguladora.

6.3.4. Aditivos

En general, el empleo de ligandos como ciclodextrinas y poliéteres macrocíclicos como aditivos, permite un notable incremento de la

selectividad debido a las diferencias que exhiben una serie de compuestos pese a su analogía química (por ejemplo, isómeros posicionales y enantiómeros) en sus constantes de formación de los complejos de inclusión. Aditivos tales como *sales neutras*, *anfolitos*, *alquilaminas* y *polímeros neutros* se pueden usar para reducir o controlar el FEO y la adsorción de proteínas a la pared del capilar.

La modificación de la polaridad y la viscosidad de la disolución de separación por adición de disolventes orgánicos miscibles (por ejemplo alcoholes, acetonitrilo, etc.) puede aprovecharse también para potenciar las separaciones en CE, pues cambian las movilidades electroforéticas y electroosmóticas de los analitos. Además, pueden usarse para potenciar la solubilidad de analitos hidrofóbicos.

También puede manipularse la viscosidad de la disolución reguladora (y por tanto el EOF) y la movilidad electroforética por adición no sólo de metanol y acetonitrilo sino de alcoholes de mayor peso molecular (ej. propanol, glicerina) que aumentan la viscosidad del medio de forma notable.

Así mismo pueden adicionarse sustancias poliméricas solubles, tales como, metilcelulosa e hidroxipropilmetilcelulosa para reducir el potencial zeta de la pared interna del capilar, y por tanto minimizar el fenómeno de la electroósmosis y reducir significativamente los fenómenos indeseables de adsorción.

6.4. Tipo y tiempo de inyección

La muestra se puede introducir en el capilar usando la modalidad hidrostática o hidrodinámica (gravedad, presión o vacío) y electrocinética. La inyección **hidrodinámica** es la modalidad mas comúnmente usada y se puede realizar elevando el vial a una altura determinada por encima del nivel inicial (gravedad), aplicando presión al vial de muestra (presión) o haciendo el vacío en el vial de salida. En general, en esta modalidad, el vial de entrada debe contener los analitos y el de salida ser un vial vacío

(desecho). En la inyección **electrocinética**, el vial de salida debe ser un vial con disolución de separación para que se pueda establecer la corriente entre los dos extremos.

El tiempo de inyección debe ser la última variable experimental a optimizar en un método. Se usará mayor o menor tiempo en función de la sensibilidad que se quiera conseguir (mayor tiempo de inyección, mayor sensibilidad) o en función del número de analitos que se estén separando. Si se analiza una mezcla con un elevado número de analitos, muy probablemente no se podrá emplear tiempos de inyección elevados ya que se pueden producir solapamientos entre picos.

B-2. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

1. Introducción

Los inicios de la Cromatografía, que la evolución convirtió en la actual HPLC, se centraron en los trabajos que Tswett¹⁵⁷⁻¹⁵⁹ y Day¹⁶⁰ realizaron en columnas abiertas con rellenos sólidos variados, predominantemente alúmina. Después de estos primeros hallazgos pasaron unos veinte años, en los que la cromatografía no fue apenas objeto de estudio de interés; es al inicio de la década de los treinta cuando parece redescubrirse y ya no deja de desarrollarse de modo prácticamente continuo^{161,162}. Se comprobó entonces que disminuyendo el tamaño medio de la partícula de relleno, se conseguía, en líneas generales, mejorar la calidad de las separaciones. Sin embargo, este hecho condicionaba enormemente los tiempos de análisis, haciéndolos del todo impracticables. Esta cromatografía en columna abierta se conoce como cromatografía clásica o gravitatoria, ya que la fase portadora (móvil) recorre el relleno por la simple acción de la gravedad. Presentaba importantes inconvenientes desde un punto de vista práctico¹⁶³: lentitud, poco eficaz, tediosa, no daba directamente cromatogramas, etc.

Estos inconvenientes fueron restrictivos en el desarrollo de la cromatografía de líquidos en columna, e hicieron que su evolución fuese algo más lenta que la Cromatografía de Gases (GC).

¹⁵⁷ Tswett M., *On a new category of adsorption phenomena and their application to biochemical analysis*, Proc. Warsaw Soc. Nat. Sci., Biol. Sect. XIV (6) (1903). Lecture presentada en la sección de Biología de una reunión científica llamada *Warsaw Society of Natural Sciences*.

¹⁵⁸ Tswett M., *Zur Kenntnis der Phaeophyceenfarbstoffe*, Ber. dtsc. botan. Ges. 24, 235 (1906).

¹⁵⁹ Tswett M., *Adsorptions analyse und chromatographische Methode. Anwendungen auf die Chemie des Chlorophylls*, Ber. Deutsch. Bot. Ges. 24, 384 (1906).

¹⁶⁰ Day, Proc. Am. Phil. Soc. 36, 112 (1897).

¹⁶¹ Kuhn R., Lederer E., *Zerlegung des Carotins in seine Komponenten. (Über das Vitamin des Wachstums, I. Mitteil.)*, Ber. dtsc. Chem. Ges. 641, 349 (1931).

¹⁶² Cela R., Lorenzo R.A., Casais M.C., *Cromatografía líquida en columna en Técnicas de separación en Química Analítica*. Ed. Síntesis S. A. Madrid. (2002) Pp 399-498.

¹⁶³ Valcárcel Cases M., Gómez Hens A., *Cromatografía líquida en columna (I). Generalidades en Técnicas analíticas de separación*. Ed. Reverté S. A. (1990) Pp 437-484.

Empezaba a parecer evidente que para que la cromatografía de líquidos en columna se convirtiese en una modalidad competitiva era preciso trabajar a elevadas presiones en lugar de utilizar sólo la fuerza de la gravedad¹⁶⁴⁻¹⁶⁷. La presión elevada (entre 500 y 5000 psi) de la fase móvil líquida:

- Permitiría reducir el tamaño de partícula de la fase estacionaria, que aunque muy empaquetada, deja que la fase móvil la atraviese. De este modo se podría aumentar espectacularmente la eficacia separativa.
- Reduciría drásticamente la duración de una separación cromatográfica (de 5 a 50 veces), y se haría equiparable en este aspecto a la GC.
- Permitiría una detección continua del eluido.

Lógicamente, esta nueva configuración a presión elevada comportaba complicaciones técnicas en comparación con la modalidad clásica, y un notable aumento del coste de adquisición y mantenimiento del instrumento. Pero este aspecto quedaba minimizado cuando se observaba la enorme potencialidad que presentaba, ya que podía cubrir aspectos inabordables o poco recomendables en GC (compuestos iónicos, muy polares, termolábiles, no volátiles, fases acuosas de muestra...). Su desarrollo comercial pleno empezó al comienzo de los años setenta.

En la Tabla B-5 se muestra una comparación entre las características del modo convencional y de alta eficacia; además se incluyen otros modos que emplean columnas de diámetros internos menores y flujos de fase móvil muchos más pequeños (microcolumnas, nanocolumnas...).

¹⁶⁴ Calvin Giddings J., *Dynamics of Chromatography. Principles and Theory*. Ed. Marcel Dekker. (1965).

¹⁶⁵ Zinder L.R., *Modern Practice of Liquid Chromatography. Before and after 1971*, J. Chem. Education 74, 37 (1997). (Waters symposium: high-performance liquid chromatography).

¹⁶⁶ Kirkland J.J., *Modern Practice of Liquid Chromatography*, Ed. Wiley-Interscience, New York. (1971).

¹⁶⁷ Greibrokk T., *The contribution of Csaba Horvath to liquid chromatography*, J. Sep. Sci. 27, 1249 (2004).

TABLA B-5. *Parámetros característicos de las diferentes formas de la cromatografía líquida en columna*

Parámetro	LC convencional	LC alta eficacia (HPLC)	Micro LC	LC capilar	Nano LC
Diámetro interno de la columna	10-15 mm	1.5-4.5 mm	0.8 mm	0.18-0.32 mm	0.075-0.1 mm
Longitud del lecho cromatográfico	50-200 cm	3-30 cm	5-25 cm	5-25 cm	15-25 cm
Diámetro medio de partícula	>150-200 μm	3-40 μm	3-5 μm	3-5 μm	5 μm
Flujo de fase móvil	1-2 ml/min	0.2-2.5 ml/min	10-100 $\mu\text{l}/\text{min}$	1-10 $\mu\text{l}/\text{min}$	0.1-1 $\mu\text{l}/\text{min}$

La Cromatografía Líquida de Alta Resolución es una técnica de separación en la que una mezcla de compuestos se distribuye entre dos fases (una fase móvil (f.m.) y una estacionaria (f.e.)), teniendo lugar la separación en función de las distintas afinidades que presente cada compuesto de la mezcla por las diferentes fases. La fase estacionaria es un sólido poroso, generalmente en forma particulada, o bien una fina capa de sustancia líquida ligada a un soporte sólido, contenido en el interior de un tubo habitualmente metálico que da lugar a la columna cromatográfica. La fase móvil es un líquido, ya sea un disolvente o una mezcla de disolventes, a veces con un pH modificado mediante adición de ácidos, bases o sistemas tampón.

2. Instrumentación en HPLC

Un sistema moderno de HPLC está formado por los siguientes componentes ¹⁶⁸:

- ✓ **Bomba:** es la encargada de impulsar el/los disolventes al resto del sistema. Las bombas modernas tienen la capacidad para impulsar

¹⁶⁸ Loro Ferrer J.F., *Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)* en *Manual de Cromatografía*. Ed. Dirección General de Universidades e Investigación. Consejería de Educación, Cultura y Deporte. Gobierno de Canarias. (2001) Pp 19-51.

varios disolventes en proporciones variables y programables, y disponen de sistema de desgasificación de la f.m.

- ✓ **Inyector:** permite la introducción de una cierta cantidad de muestra en el sistema.
- ✓ **Columna cromatográfica:** contiene la f.e. y en ella tiene lugar la separación de los analitos. A veces va precedida de una pre-columna para impedir que lleguen a la columna componentes de la muestra que puedan dañar la f.e.
- ✓ **Horno termostatzado:** mantiene la temperatura de la columna constante, asegurando una mayor reproducibilidad en las separaciones (no siempre es necesario).
- ✓ **Detector:** encargado de producir señales o respuestas analíticas ante la presencia de un determinado compuesto. Puede utilizarse más de uno simultáneamente, colocándolos en serie.
- ✓ **Sistema de adquisición de datos:** actualmente los ordenadores, dotados con programas específicos se encargan de ello.

En una separación por HPLC, la f.m. impulsada por la bomba transporta una banda de muestra a través de la columna cromatográfica. En ésta, los analitos interaccionan con la fase estacionaria de tal forma que aquellos que sean más afines con la f.m. serán menos retenidos por la f.e. y eluirán antes; mientras que aquellos que tengan más afinidad por la f.e. avanzarán más lentamente a través de la columna y eluirán, por tanto, más tarde. Una vez eluido cada compuesto debe ser detectado. Para ello, se colocan a la salida de la columna cromatográfica uno o varios detectores que proporcionarán una respuesta al paso de los analitos (absorbancia, emisión fluorescente, conductividad, etc). El procesado de esta señal produce el cromatograma, en el que se representa la respuesta obtenida por el detector frente al tiempo. Cada analito, por tanto, estará representado por un pico que poseerá un determinado tiempo de retención (t_R). La intensidad de cada pico será directamente proporcional al factor de respuesta y a la concentración del analito correspondiente en la muestra.

3. Tipos de HPLC

Podemos encontrar una gran variedad de alternativas según la naturaleza de la f.e., como puede observarse en la Tabla B-6¹⁶⁹.

TABLA B-6. Diferentes modos generales de HPLC

Nombre	Fase Estacionaria
Partición	Líquido retenido por un sólido soporte
Adsorción	Sólido con propiedades superficiales
Cambio iónico	Sólido con propiedades cambiadoras de iones
Afinidad	Sólido con propiedades de retención bioespecífica
Exclusión por tamaños	Sólido con porosidad controlada
Quiral*	Reactivo quiral unido a f.m. o al soporte sólido

*Muchos autores no la consideran un tipo de Cromatografía *per se*, sino más bien incluida en la cromatografía de partición o reparto^{170,171}.

En ella se observa que un sólido es la f.e. activa más frecuente. Este sólido tiene diferentes fundamentos de actuación¹⁷²:

- ✦ *Físico* en cromatografía de geles (exclusión). En este caso tiene la simple misión de un tamiz o filtro. La causa de la retención en el lecho cromatográfico es puramente física: el tamaño molecular.
- ✦ *Físico-químico* en cromatografía de adsorción, que se basa en la actividad superficial del mismo que retiene con mayor o menor "fuerza" a los solutos. En la cromatografía de partición clásica (también conocida como cromatografía de reparto), la absorción es el fundamento de la retención de la f.e. líquida.
- ✦ *Químico* en cromatografía de cambio iónico, que se basa en el intercambio de especies cargadas (aniones y cationes)

¹⁶⁹ La cromatografía líquida se puede clasificar atendiendo a varios criterios: a la forma física global de la fase estacionaria, a la dirección del flujo de la fase móvil, a la eficiencia de separación, a la interacción que se produce entre la fase estacionaria y el soluto, etc.

¹⁷⁰ Armstrong D.W., *Optical isomer separation by Liquid-Chromatography*, Anal. Chem. 59, A84& (1987).

¹⁷¹ Lough W.J., *Chiral Chromatography*. Ed. Blackie. Glasgow. (1989).

¹⁷² Valcárcel Cases M., Gómez Hens A., *Cromatografía líquida en columna (II). Técnicas de adsorción y partición en Técnicas analíticas de separación*. Ed. Reverté S. A. (1990) Pp 485-531.

- ✦ *Bioquímico* en la cromatografía de afinidad, que se basa en la retención reversible de solutos de naturaleza bioquímica basada en la interacciones bioespecíficas (acoplamiento llave-cerradura).

La distribución de un soluto entre las dos fases tiene lugar debido a la interacción en diferente proporción de las moléculas del mismo con las moléculas de cada fase. Esta interacción es debida a la existencia de tres tipos básicos de fuerzas intermoleculares: iónicas, polares y dispersivas. Además existen otras más puntuales: adsorciones bioespecíficas y exclusión por tamaños.

En general, podemos decir que (Figura B-12) la cromatografía de partición o reparto se aplica a compuestos polares no iónicos; la cromatografía de adsorción separa especies no polares, isómeros e hidrocarburos alifáticos; la cromatografía de intercambio iónico permite analizar compuestos iónicos de peso molecular bajo; los analitos de peso molecular superior a 10.000 se separan mediante cromatografía de filtración sobre gel (de exclusión).

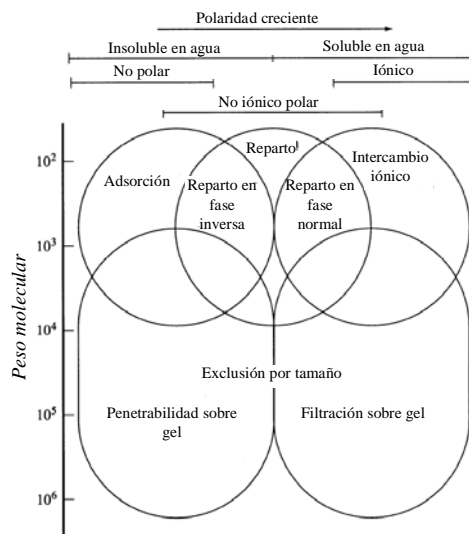


FIGURA B-12. Aplicación de los distintos modos de HPLC

3.1. Cromatografía de partición o de reparto

Este tipo de HPLC es el tipo de cromatografía de líquidos más ampliamente utilizado y el que hemos utilizado en la parte experimental correspondiente a esta técnica.

El fundamento de este tipo de cromatografía es el reparto o la distribución de los solutos entre una f.m. líquida y otra f.e. inmisible soportada sobre un sólido inerte; es decir, la causa de la discriminación entre los solutos se encuentra, de manera genérica, en las diferencias de solubilidad.

Deben establecerse dos distinciones básicas en este tipo de cromatografía. La primera se refiere a la naturaleza de las fases líquidas implicadas:

- En **fase normal**: la f.m. es de naturaleza no polar (o poco polar) y la f.e. es fuertemente polar (podemos decir que guarda cierta semejanza con la cromatografía de adsorción en este aspecto).
- En **fase invertida** (o **reversa**): la f.e. es no polar y la f.m., polar; se trata sin lugar a dudas del tipo de cromatografía estrella, ya que una gran mayoría de muestras de interés en diversos ámbitos tienen naturaleza hidrofílica.

Otra distinción se podría hacer dentro de la cromatografía que nos ocupa atendiendo a la relación entre el sólido soporte inerte y la f.e. líquida activa:

- Fase estacionaria adsorbida: retenida por interacción físico-química del disolvente con los sitios activos del sólido soporte, y
- Fase estacionaria ligada: cuando se establece un anclaje químico entre el sólido soporte y las moléculas de la fase estacionaria líquida. Las ventajas de esta posibilidad son más que notorias en términos de estabilidad, versatilidad, rapidez, etc.

La cromatografía de partición en fase ligada químicamente ha monopolizado la casi totalidad de aplicaciones prácticas. Además, el modo de trabajo en fase invertida, ha ocupado el 90% de las aplicaciones analíticas de interés.

3.1.1. Relleno de las columnas

Una fase ligada químicamente aprovecha los grupos silanol libres de la superficie de las partículas de sílice haciéndolas reaccionar con alcóxidos o clorosilanos, de modo que finalmente los grupos silanol (que suelen ser indeseables en la mayoría de los casos) quedan bloqueados y, a la vez, la superficie del soporte sílice queda recubierta de una capa firmemente unida al mismo cuya funcionalidad viene determinada por los reactivos de partida y, por tanto, puede variarse en un amplio intervalo.

En la superficie de la sílice se pueden producir reacciones con reactivos mono o polifuncionales. En teoría, la reacción con reactivos monofuncionales produce capas de "pelos" hidrocarbonados sobre la superficie de la sílice; la longitud del grupo que se une a la sílice depende lógicamente del reactivo que se eligiese en la reacción (C18 (ODS), C8, fenil y un largo etc)¹⁷³. Las columnas más empleadas son, sin lugar a dudas las C18; los porcentajes para cada tipo de fase estacionaria se muestran en la tabla B-7¹⁷⁴.

¹⁷³ Rubinson J.F., Rubinson K.A., *Separaciones y cromatografía en Química Analítica contemporánea*. Ed. Prentice Hall, México. (2000) Pp 404-457.

¹⁷⁴ Majors R.E., *The cleaning and regeneration of Reversed-Phase HPLC Columns*, LG-GC Europe Column Watch 2-6 (2003).

TABLA B-7. *Uso relativo (%) de las fase estacionaria más usuales*

<i>Fase estacionaria</i>	<i>% uso relativo</i>
C18	39
C8	26
Cianopropil*	14.5
Fenil	12
C4	3.7
Interacción hidrofóbica	1.8
C2	1.1
C1	0.8
Otros	0.8
Polímeros	0.8

*Se incluye también el uso en fase normal

Por el contrario, en el caso de reactivos trifuncionales, las reacciones no sólo pueden tener lugar con los grupos silanol libres de la superficie del soporte, sino también con los propios grupos silanol que se forman en el curso de las reacciones. Esto conduce a un cierto grado de entrecruzamiento y se habla entonces de que el material resulta polimérico y ya no es una monocapa de pelos hidrocarbonados. Los grupos silanol resultantes (igual que los no bloqueados en el caso de reactivos monofuncionales) se eliminan de manera casi completa mediante reacción con silanos monofuncionales de pequeño tamaño molecular (por ejemplo, TMCS, en un proceso que se conoce como *end capping*). En la Figura B-13 se muestra cómo se da el proceso:

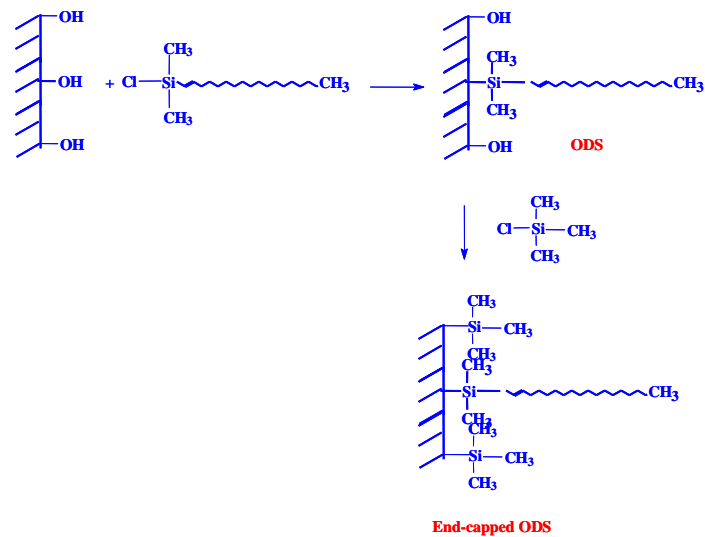


FIGURA B-13. Proceso de "end capping"

Como se puede pensar de modo intuitivo, al aumentar la longitud de la cadena hidrocarbonada que se liga sobre la superficie de la sílice, ésta resultará cada vez menos polar.

En la Figura B-14 se muestra el aspecto típico del interior de una columna C18, donde se ven las cadenas de 18 carbonos (grupos octadecilo) unidas a la sílice. Estos grupos orgánicos ligados, producen un efecto similar al que tendría una capa extremadamente fina de disolvente orgánico sobre la superficie de las partículas de sílice.

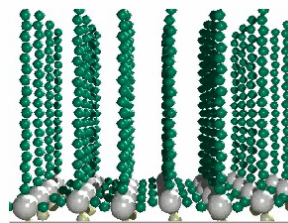


FIGURA B-14. Interior de una columna C18

Un segundo tipo de fase estacionaria usada en cromatografía en fase reversa está compuesta de partículas esféricas de polímero orgánico¹⁷⁴. Un polímero típico es una resina compuesta de poliestireno y divinilbenceno. Los componentes del divinilbenceno forman enlaces entre las cadenas de poliestireno-enlaces cruzados. Los enlaces cruzados producen un

reforzamiento físico del polímero, de modo que una mayor densidad de enlaces cruzados se asocia con un material rígido.

Otra fase estacionaria relativamente nueva es una variedad de grafito. El material se llama carbono granítico poroso (PGC), que es fundamentalmente carbono puro, y las superficies son molecularmente planas. El PGC es menos polar que los disolventes, por lo que, en general, se incluye en el tipo de rellenos para la cromatografía en fase reversa. Sin embargo, la propiedad más interesante del PGC es que la fuerza de interacción entre él y las moléculas del soluto depende casi exclusivamente del área molecular que contacta con las láminas de carbono^{175,176}.

Con las columnas convencionales no se pueden usar partículas de tamaño mucho menor de 5 μm , ya que se produciría un gran aumento de presión, no tolerado por los equipos de HPLC convencionales. De hecho, es prácticamente imposible trabajar con columnas rellenas con fases estacionarias de menos de 3 μm de diámetro de partícula¹⁷⁷.

Por el contrario, sí se ha podido trabajar con partículas de tamaños inferiores a 1 μm mediante la técnica de UHPLC recientemente patentada (Ultra-high-pressure liquid chromatography)¹⁷⁸, que es básicamente una adaptación de un equipo de HPLC para trabajar a presiones elevadas. Lo malo es que esta técnica aún no ha llegado a ser parte del análisis rutinario.

La aparición de nuevas fases estacionarias denominadas monolíticas ha supuesto una gran innovación en lo relativo a los rellenos de las columnas de HPLC, superando el problema asociado a la baja permeabilidad de los

¹⁷⁵ Hypercarb™ HPLC Columns Technical Guide, the solution for problem separations de Thermo Electron Corporation.¹⁷⁶ Rubinson K.A., Rubinson J.F., "Cromatografía líquida" en "Análisis Instrumental". Ed. Pearson Education S. A. Madrid. (2000) Pp 636-676.

¹⁷⁷ Eeltink S., Decrop W.M.C., Rozing G.P., Schoenmakers P.J., Kok W.T., *Comparison of the efficiency of microparticulate and monolithic capillary columns*, J. Sep. Sci. 27, 1431 (2004).

¹⁷⁸ Thompson J.W., Mellors J.S., Eschelbach J.W., Jorgenson J.W., *Recent advances in ultrahigh-pressure liquid chromatography*, LC GC North America 24, 16 (2006)

empaquetamientos tradicionales^{179,180}. Las columnas monolíticas son columnas cuya fase estacionaria, en lugar de ser un sólido particulado, está formada por un material sólido dispuesto en una sola pieza, con una estructura tridimensional compuesta por un esqueleto con poros de diferentes tamaños (macroporos y mesoporos).

Su elevada permeabilidad tiene dos ventajas fundamentales: por un lado permite aumentar considerablemente la longitud de la columna (aumentando, por tanto, el número de platos teóricos). Por otro lado, permite separaciones más rápidas gracias a la posibilidad de operar con flujos de f.m. elevados sin pérdida de eficiencia.

4. Detectores en HPLC

Muchos son los detectores que se han acoplado a la técnica separativa de HPLC (UV-vis, índice de refracción, fluorescencia, electroquímicos, radioactivos, de dispersión de luz (ELS), espectrómetros de masas, etc.).

Dos tipos de detectores en HPLC se han usado en el desarrollo experimental de esta memoria: espectrofotométricos UV-vis y espectrómetro de masas. Como ambos fueron descritos en extensión en el apartado de CE, remitimos a aquella sección.

5. Desarrollo de un método de HPLC

En la puesta a punto de un método cromatográfico, se persigue obtener una buena resolución, tiempo de análisis cortos, precisión, altura de pico, presión adecuada en el sistema y consumir el menor disolvente posible. Se recoge en distintos libros de texto sobre cromatografía o técnicas

¹⁷⁹ Lin Z., Xie Z.H., Lu X.H., Lin X.C., Wu X.P., Chen G.N., *On-column coaxial flow chemiluminescence detection for underivatized amino acids by pressurized capillary electrochromatography using a monolithic column*, *Anal. Chem.* 78, 5322 (2006).

¹⁸⁰ Wu N.J., Dempsey J., Yehl P.M., Doveloglou A., Ellison D., Wyratt J., *Practical aspects of fast HPLC separations for pharmaceutical process development using monolithic columns*, *Anal. Chim. Acta* 523, 149 (2004).

separativas en general^{162,181}, que un esquema o diagrama de flujo a seguir en el desarrollo de un procedimiento de cromatografía líquida en fase invertida podría ser el que refleja la Figura B-15:

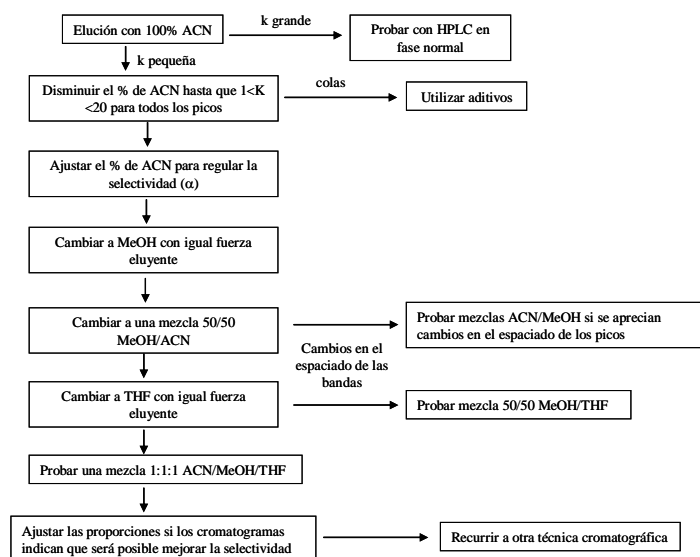


FIGURA B-15. Diagrama de flujo en el desarrollo de un procedimiento de cromatografía líquida en fase invertida

El esquema muestra el modo en el que se puede aproximar la optimización experimental de una separación usando este tipo de cromatografía líquida mediante un número limitado de experimentos.

Inicialmente, se puede trabajar con una f.m. de elevada fuerza eluyente (acetoniitrilo 100%) y un flujo de 1-1.5 ml/min para columnas de dimensiones usuales (10-25 cm de longitud por aproximadamente 4.6 mm de diámetro interno), habiendo previamente seleccionado unas condiciones de detección que permitan establecer la presencia de todos los compuestos de interés. Si la retención de los compuestos es muy baja, habremos elegido bien la cromatografía líquida en fase reversa (RP-HPLC). Habrá entonces que disminuir la fuerza eluyente de la f.m. para lograr separaciones más prácticas; se persigue que todos los componentes de interés manifiesten factores de retención (k) comprendidos entre 1 y 20. En principio, al disminuir

¹⁸¹ Snyder L.R., Kirkland J.J., Glajch J.L. *Systematic approach to the Reversed-Phase separation of regular samples en Practical HPLC method development*. Ed. John Wiley & Sons, Inc. New York. (1997) Pp 403-437.

la proporción de modificador es de esperar una mayor retención, que no en todos los casos vendrá acompañado de una mejor separación.

Si los picos aparecen con colas, suele ser necesario adicionar a la f.m. una pequeña cantidad de aditivo (TEA, trietilamina) para reducir o eliminar ese efecto.

Cuando tengamos detectado cuál es un valor (%) de ACN que logra una separación aceptable, será un buen momento para ver el efecto que produce un cambio en la naturaleza del modificador orgánico. Una sencilla prueba sería cambiar el ACN por metanol; aunque como la proporción de ACN seleccionada proporcionaba una retención aceptable, deberíamos utilizar una proporción de metanol en la f.m. con igual o similar fuerza eluyente que la correspondiente a los mejores ensayos realizados hasta ese momento (por ejemplo, el equivalente isoelutrópico en metanol al 40% de ACN, es el 51%). Si el metanol no funcionase bien, podríamos probar nuevos cambios (THF), o bien mezclas ternarias o incluso cuaternarias.

Este proceso puede ser más o menos largo según la dificultad de la separación, aunque por lo general, se suele disponer de alguna información bibliográfica y ello puede ahorrar gran parte de este trabajo. Hoy en día, incluso se puede recurrir a sistemas de optimización asistida por ordenador.

5.1. Elución isocrática y en gradiente

En ciertas ocasiones, las muestras incluyen analitos de muy diversa naturaleza y con propiedades físico-químicas diferentes, pudiendo resultar algunas especies de interés de la muestra muy retenidas mientras que otras eluyen muy rápidamente. En este caso, los cambios de selectividad comentados antes no surtirían efecto, ya que afectarían de modo distinto a unas y otras especies. Una solución a este tipo de problemas, consistiría en poder aprovechar las modificaciones tanto de la fuerza eluyente (retención), como de la naturaleza (selectividad) de la f.m. de una forma dinámica, modificándolas en el tiempo durante la propia elución.

Podemos emplear una elución isocrática o una elución en gradiente. En las eluciones isocráticas se mantiene constante la fuerza del eluyente de la f.m. En las eluciones por gradiente, en cambio, es la fuerza eluyente de la f.m. la que se modifica durante la elución y pueden diseñarse de modo que la selectividad se mantenga constante o no.

El saber cuándo debemos utilizar o no una elución en gradiente no es simple, ya que no podemos estar seguros de que sea lo más conveniente simplemente porque una elución isocrática no pueda resolver el problema. Un criterio práctico bastante útil es el propuesto por Snyder¹⁸². Consiste en ejecutar un gradiente lineal entre extremos de porcentaje de modificador en un tiempo razonable, tratando de que los picos sean eluidos con factores de retención inferiores a 20. Se mide el intervalo de tiempo entre la aparición del primero y el último de los picos de la muestra y se divide por el tiempo de ejecución del gradiente. Si el cociente resulta ser superior a 0.25 será aconsejable trabajar usando un gradiente, puesto que ello significa que una elución isocrática que, con el mismo modificador pudiera proporcionar factores de retención análogos produciría muy mala separación de los primeros picos, o bien, que para mantener dicha resolución en valores aceptables, el tiempo requerido para la elución isocrática correspondiente sería muy elevado.

¹⁸² Snyder L.R., Kirkland J.J., Glajch J.L., *Non-ionic samples: Reversed- and Normal-Phase HPLC* en *Practical HPLC method development*. Ed. John Wiley & Sons, Inc. New York. (1997) Pp 233-264.

Una vez demostrada la conveniencia o necesidad de trabajar en gradiente, habrá que optimizar otra serie de parámetros fundamentales que no quedaban recogidos en el esquema anterior como son:

✖ Temperatura

Será necesario comprobar si es necesario o no controlar y mantener constante la temperatura en las separaciones, especialmente si el procedimiento de separación se va a utilizar en análisis de rutina.

✖ pH

El pH de la f.m. afectará la retención si la estructura de las moléculas del soluto resulta afectada. Típicamente, las especies que pueden presentarse en forma protonada y desprotonada en el intervalo de pH de trabajo usual en RP-HPLC serán afectadas, puesto que ambas formas, manifestarán diferente retención. A efectos prácticos, si se quiere utilizar el pH como un parámetro capaz de alterar sustancialmente la separación, tendrá que ajustarse el pH de la f.m. de modo que su valor esté comprendido entre el $pK_a \pm 1$ de la especie o especies de interés. Aunque aquí, hemos de hacer notar que cuando la proporción de disolvente orgánico crece en la f.m., la determinación de la escala de pH se hace insegura y los valores de pK_a de los solutos pueden resultar significativamente alterados en ocasiones.

6. Semejanzas y diferencias entre CE y HPLC

La electroforesis capilar y la cromatografía líquida de alta resolución pueden considerarse técnicas separativas complementarias que, al trabajar con muestras en estado líquido, presentan ciertas **semejanzas**:

⊙ La primera semejanza entre la CE y la HPLC es que ambas pueden operar generalmente con detección *on-line* y utilizan sistemas de detección que recogen la señal respuesta frente al tiempo. La detección *on-line* otorga a estas técnicas la capacidad de hacer análisis cuali y cuantitativo. Los resultados de la CE o de la HPLC (electroferogramas o cromatogramas)

muestran los analitos separados, y estos pueden ser caracterizados por su tiempo de retención. Además, ambas técnicas pueden ser acopladas a más de un sistema de detección. El más ampliamente utilizado es el UV/Vis, pero, cada vez más, la fluorescencia, la espectrometría de masas y la detección electroquímica (conductividad, amperometría y potenciometría) se están convirtiendo en sistemas de detección ampliamente utilizados. Hoy en día, hay disponibles comercialmente instrumentos de CE de tercera generación, que tienen incluso la opción de trabajar con más de dos detectores simultáneamente.

⊙ Ambas pueden utilizarse empleando diferentes modos, y existe un paralelismo entre los modos electroforéticos que se pueden emplear y los modos en HPLC. Así: la electroforesis capilar en zona (CZE) o electroforesis capilar en zona libre y el isoelectroenfoco capilar (CIEF) son similares a la cromatografía de intercambio iónico, ya que las separaciones se basan en las diferencias de carga y tamaño entre los analitos; la electroforesis capilar en medios micelares (MECK) simula a la cromatografía en fase reversa; la cromatografía por exclusión de tamaño y la electroforesis capilar en gel separan atendiendo al tamaño molecular de las sustancias a separar, y las interacciones por afinidad usadas en cromatografía sirven también en CE.

⊙ Tanto los sistemas de CE como los de HPLC pueden ser automatizados. Los automuestreadores y los sistemas automáticos y programas informáticos para controlar todos los pasos de un método separativo están presentes en prácticamente todos los instrumentos disponibles comercialmente.

⊙ La automatización descrita en el punto anterior permite incluso realizar la recolección de distintas fracciones de interés, pero el límite máximo de carga de muestra en CE ha ocasionado que la recolección o aislamiento de fracciones esté en el rango de nanogramos. Lógicamente las limitaciones en la cantidad de muestra que puede ser inyectada también limitan la cantidad de muestra que puede ser recolectada. Como modificaciones y mejoras del proceso tecnológico se está persiguiendo un

aumento en la cantidad de muestra a inyectar, ya que esto mejoraría proporcionalmente la capacidad de la CE micro-preparativa.

Aunque las semejanzas entre las dos técnicas son claras, también existen **diferencias** significativas que han conducido al desarrollo simultáneo de ambas:

⊙ Una de las razones de más peso que ha favorecido el desarrollo de la CE es su capacidad para facilitar la separación de macromoléculas en disolución. Los grandes biopolímeros son resistentes a las transferencias de masa y, por lo tanto, se separan más eficientemente mediante técnicas *non-partitioning* como la electroforesis, que mediante técnicas *partitioning* como la cromatografía.

Las moléculas pequeñas sí se ajustan bien a las capacidades de la cromatografía a causa de su buen coeficiente de difusión y sus características en lo que a transporte de materia se refiere. Los grandes biopolímeros, como las proteínas, se ajustan mejor a las capacidades de las técnicas electroforéticas por la resistencia que ofrecen a la difusión y a la transferencia de masa. En teoría, las separaciones en CE pueden lograr eficacias cercanas a los millones de platos teóricos para moléculas grandes.

⊙ Un factor adicional que lleva a la CE a proporcionar una mayor eficacia es el perfil del flujo. En HPLC, las fuerzas de fricción entre el sólido y el líquido dan lugar a perfiles de flujo laminares o parabólicos, existiendo un gradiente de velocidad importante que da lugar a un perfil de velocidades que es mayor en el centro y menor en las proximidades de las paredes. En CE, el flujo final tiene un perfil prácticamente plano que hace que todos los solutos, independientemente de su posición en la sección del capilar, presenten la misma velocidad eluyendo como picos estrechos y, por tanto, con alta eficacia.

⊙ Otra diferencia de estas dos técnicas es que no hay correlación entre los tiempos de retención en HPLC y los tiempos de migración en CE; el orden de elución no será el mismo para ambas técnicas.

⊙ Una diferencia de las más notables se halla en el volumen requerido de muestra y disoluciones reguladoras o de separación empleadas. Mientras HPLC consume litros de fase móvil, la CE necesita sólo unos mililitros de disolución reguladora.

⊙ Cuando la detección se realiza mediante técnicas ópticas, la longitud del paso de luz en la celda de detección en HPLC es normalmente de varios milímetros, mientras que en CE es del orden de micrómetros.

⊙ La corrección del área en función del tiempo de migración es necesaria para llevar a cabo el análisis cuantitativo mediante la CE. Hay una tendencia generalizada que lleva a muchos analistas a cometer el error de integrar un electroferograma como si fuese un cromatograma. En HPLC, la separación de los analitos se realiza en la columna y la detección se hace una vez que estos han sido eluidos de la misma. El detector está localizado después de la columna separativa y la detección se lleva a cabo off-columna. La velocidad a la cual viajen los analitos a través del detector es independiente de la columna y de la separación; ésta sólo depende del flujo de la bomba de alta presión. Si el flujo es constante, como ocurre típicamente en HPLC, entonces todos los analitos se moverán a través del detector a una velocidad constante.

Contrastando con esto, la detección en CE es casi siempre on-columna. En este tipo de detección, el detector está localizado en algún punto a lo largo del capilar en el que la separación aún se está llevando a cabo. Como la separación se basa en que los analitos migran a diferentes ritmos, los analitos separados pasarán a través del detector a distintas velocidades. Estas diferencias de ritmo, para cada analito, deben ser consideradas cuando se desarrolle un trabajo cuantitativo.

CAPÍTULO 3

Detectores luminiscentes sencillos para electroforesis capilar basados en LEDs, fibra óptica y CCDs para la determinación de aminos en cerveza y de proteínas

Como ya comentamos en la Introducción de esta memoria, se puede afirmar que la fluorescencia inducida por láser (LIF) es el sistema detector fluorescente más ampliamente utilizado en CE debido a que las características de los láseres como fuentes de excitación como son: gran facilidad en la focalización de la radiación en la ventana del capilar, grandes intensidades de señal, estrechas anchuras de banda y elevada coherencia, se adaptan perfectamente a las necesidades instrumentales de la CE.

El uso de láseres presenta pues importantes ventajas, aunque también tiene una serie de inconvenientes entre los que destaca su excesivo precio, su tamaño, la energía que se necesita para alimentar estas fuentes de excitación y las longitudes de onda limitadas a la fuente láser, desventajas que van en contra de algunas tendencias actuales de la Química Analítica como son la miniaturización y el bajo coste. Debido a esto, en los últimos años se han desarrollado y utilizado otras fuentes de excitación que aunque no sean tan intensas como los láseres, son mucho menos voluminosas, más económicas y necesitan fuentes de alimentación de pequeñas dimensiones. Las fuentes con estas características son los LEDs.

Este capítulo tercero tiene como principal objetivo el diseño de detectores fluorescentes sencillos y novedosos basados en el uso de LEDs, fibra óptica y CCDs; denominamos a este sistema durante el trabajo como *LED-IF-CE*.

Para su uso como sistemas de detección luminiscente para CE se han aplicado a dos familias de compuestos completamente diferentes, ejemplos de moléculas no fluorescentes y fluorescentes: por una parte, aminas y aminoácidos que requieren ser derivatizados previamente (detección fluorimétrica previa derivatización fluorescente), y por otro lado, proteínas luminiscentes con alto rendimiento cuántico de fluorescencia (detección fluorimétrica directa por fluorescencia nativa).

Como consecuencia de ello se han desarrollado varios métodos electroforéticos para estas dos familias de compuestos que se han traducido en dos trabajos de investigación:

⇒ ***Comparative study between a commercial and a homemade capillary electrophoresis instrument for the simultaneous determination of aminated compounds by induced fluorescence detection***, publicado en *Analytical & Bioanalytical Chemistry* 386, 1835 (2006).

En este trabajo se muestra el desarrollo de dos métodos electroforéticos para determinar mediante detección fluorescente, aminas y aminoácidos en muestras de cerveza, mediante su previa derivatización con fluoresceína isotiocianato (FITC). En el primero de ellos se hace uso de un detector luminiscente diseñado en nuestro laboratorio (*homemade*) que usa un LED como fuente de excitación, una celda de detección para facilitar el enfoque de la fibra óptica sobre el capilar y una CCD como sistema detector (*LED-IF-CE*); mientras que en el segundo método se usa un láser comercial de ión argón (*LIF-CE*). Por último, se lleva a cabo una exhaustiva comparación entre ambos métodos electroforéticos, mostrando ventajas y desventajas en el uso de ambos equipos. Resulta bastante interesante la comparación entre dos equipos con fuentes de excitación tan dispares: un potente y caro láser, con un simple y barato LED.

⇒ ***Simple luminescence detectors using a light-emitting diode or a Xe lamp, optical fiber and charge-coupled device, or photomultiplier for determining proteins in capillary electrophoresis: a critical comparison***, publicado en *Analytical Biochemistry* 365, 82 (2007).

En esta segunda publicación se desarrollan dos métodos electroforéticos en zona con detección fluorescente directa para la determinación de dos proteínas altamente fluorescentes presentes en algunas algas marinas, como son las ficobiliproteínas (PBPs): R-ficoeritrina (RPE) y B-ficoeritrina (BPE).

Estas proteínas han sido previamente determinadas por CE mediante FIL, presentando estas determinaciones los inconvenientes de poder encontrar láseres disponibles que encajen con las características espectroscópicas de las proteínas, aparte del elevado coste que presentan estas fuentes de excitación. Aparecen entonces los LEDs como posibles fuentes de excitación alternativas a los láseres.

En el primer método que se describe en el presente trabajo, la excitación se lleva a cabo mediante un LED y la detección con una CCD (*LED-IF-CE*), y en el segundo método se emplea un espectrofluorímetro comercial que posee una lámpara de Xe y un fotomultiplicador (*lámpara de Xe-IF-CE*). Ambos equipos se valen de la celda de detección a la que hemos hecho referencia en el anterior trabajo, que ha sido diseñada en nuestro laboratorio y que permite la focalización de la radiación sobre el capilar de separación. Ambos sistemas se acoplan con éxito a la CE para la detección de las PBPs.

Se hace además una interesante comparativa entre ambos sistemas detectores, mostrando las potenciales ventajas que presenta el sistema detector basado en el LED.

Comparative study between a commercial and a homemade capillary electrophoresis instrument for the simultaneous determination of aminated compounds by induced fluorescence detection

Silvia Casado-Terrones · Sonia Cortacero-Ramírez ·
Alegría Carrasco-Pancorbo · Antonio Segura-Carretero ·
Alberto Fernández-Gutiérrez

Received: 25 April 2006 / Revised: 25 July 2006 / Accepted: 3 August 2006 / Published online: 9 September 2006
© Springer-Verlag 2006

Abstract The performance of two capillary electrophoresis (CE) instruments, one commercial and one homemade device, were compared for the determination of derivatised aminated compounds with fluorescein isothiocyanate (FITC). The commercial CE system first uses an argon ion laser as excitation source; the homemade CE device uses an inexpensive blue-light-emitting diode (LED) as the light source and a charge-coupled device (CCD) as the detection system. After fine optimisation of several separation parameters in both devices, a co-electroosmotic flow CE methodology was achieved in coated capillary tubing with 0.001% hexadimethrine bromide (HDB), and 50 mmol L⁻¹ sodium borate at pH 9.3 with 20% 2-propanol for the determination of several amines and aminoacids. Analytical performances, applicability in beer samples and other aspects such as cost or potential for miniaturization have been compared for both devices.

Keywords Capillary electrophoresis · Laser-induced fluorescence · Light-emitting diode (LED)-induced fluorescence · Aminated compounds · Co-electroosmotic flow

Introduction

Capillary electrophoresis (CE) is a powerful analytical technique in the area of separation science [1–4]. Today, many detection systems are being used in CE, such as UV-visible absorption, fluorimetry, phosphorimetry, mass spectrometry, electrochemistry, conductivity and nuclear magnetic resonance, among others [5, 6]. This feature of CE allows the detection of a broad array of very different classes of compounds [7–11]. However, fluorescence detection methods have some of the best performance characteristics of any CE detection mode in terms of linearity, sensitivity and limits of detection (LODs) [12–15].

Excitation sources can be incoherent and coherent. One group of coherent excitation source, lasers, offer the advantages of a spectrally narrow line source and the ability to focus to very small beam diameters. Another advantage which is often overlooked is that a monochromatic excitation source implies narrow Rayleigh, and narrower and simpler Raman features which are easier to filter or remove than the spectral features found with lamps. A final advantage is that laser power can be varied over a wide range and can be optimised to the fluorescence system being studied. The greatest disadvantage is the limited number of emission lines available for reasonably priced lasers, and what is more, for analytes inherently fluorescent or derivatized using a fluorescent label, it is necessary to choose readily available lasers that can be matched to their spectral properties. Since the first laser-induced fluorescence (LIF) detection system for CE was described [16], an overwhelming number of articles have been appeared highlighting its powerful features [17–23].

Diode lasers (DLs) [24–26] afford excellent LODs, better baseline stabilities, longer lifetime and less or no

S. Casado-Terrones · S. Cortacero-Ramírez ·
A. Carrasco-Pancorbo · A. Segura-Carretero ·
A. Fernández-Gutiérrez (✉)
Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences,
University of Granada,
Avda. Fuentenueva s/n,
18071 Granada, Spain
e-mail: albertof@ugr.es

A. Segura-Carretero
e-mail: ansegura@ugr.es

maintenance compared to solid-state lasers, but the current cost of a violet DL is still expensive (ca. US \$ 2,000, depending on the output power and lifetime).

In contrast, light-emitting diodes (LEDs) as light sources are small, cheap, easily operated, available in a wide range of wavelengths from violet to near infrared, and exceptionally stable. They also have long lifetimes and provide high emission intensities. The concentrated, small, cool emitter they provide is ideal for miniature analytical devices [27–29]. The combination of all these good characteristics makes LEDs an exceptionally attractive stable excitation light source for luminescence detection in CE [30]. Despite their multiple advantages, the emission from LED sources is spatially incoherent and not monochromatic. When using LEDs as the excitation source for fluorimetric detection, considerable power loss might be expected due to failure in achieving proper focussing and obtaining the required spectral output.

The first use of an LED for a CE separation with absorption detection was reported by Yeung et al. [31]. Later, Dasgupta et al. carried out the first fluorimetric detection method with an LED as light source [32]. Since then, several methods have highlighted the wide applicability of LED-CE in direct (naturally fluorescent [33, 34] and derivative [35] compounds) and indirect determinations [36].

All these LED-induced fluorescence-CE (LED-IF-CE) detectors use plastic lenses or microscopes to focus the light from the LED to the capillary and also to collect the fluorescence emission from the capillary to the detector (which is usually a photomultiplier). It is not easy to focus the light into the capillary or transport the emitted light to the detector but the use of optical fibre for transporting the excitation light and collecting the emission fluorescence makes the optical system compact, simple and flexible. Therefore, Yang and Guan proposed the use of lenses to focus the emanating light from the LED into the capillary and an optical fibre, which has a spherical end to develop an LED-IF-CE system [37]. However, they demonstrated the difficulties of aligning the capillary with the excitation slits and the optical fibre and designed a T-style detection cell to align the optical fibre with the capillary. Our research group has recently designed [38] a detection cell for CE determinations with an LED as light source and a CCD as detection system. All the components are commercially available and reasonably cheap.

Amines and amino acids are commonly present in foods and beverages and in various other products of biological and industrial importance; moreover, biogenic amines form a group of natural anti-nutritional and possibly toxic compounds widespread in food and beverages as well. Furthermore, assessment of the content of these aminated compounds in food has attracted special attention in recent years [39–44] owing to the possibility of using the amine concentrations as an index of food quality, since the original concentration levels of biogenic amines can change

during food processing and storage and are influenced by the level of hygiene present.

The aim of this work is to compare two CE instruments: a commercial (LIF) and a homemade (LED) device. For this purpose, several derivatized amines and aminoacids have been determined in beer samples by co-electroosmotic CE methods in less than 8 and 10 min, respectively. In both CE methods the optimum electrophoretic conditions were established by means of a detailed study of the separation parameters. The advantages and disadvantages of both systems have been discussed in detail.

Materials and methods

Chemicals and samples

Analytes (glycine, alanine, methylamine, dimethylamine, ethylamine, histamine, tyramine, hexylamine, dibutylamine, putrescine, cadaverine, 1,6-hexanodiamine and agmatine) were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). Stock standard solutions of different concentrations of a mixture of all analytes were prepared in doubly deionised water. All the solutions were kept in a refrigerator at 4 °C and fresh solutions were prepared daily.

The solutions used for the derivatisation procedure were fluorescein isothiocyanate isomer I (FITC) from Panreac (Barcelona, Spain) 1.0×10^{-2} mol L⁻¹ in acetone (HPLC grade from Panreac) and 0.2 mol L⁻¹ sodium carbonate/bicarbonate buffer (pH 9) (Panreac).

For the separation, a sodium borate solution was used (Sigma) with hexadimethrin bromide (HDB), from Sigma and 2-propanol (Panreac). Sodium phosphate and CAPSO were acquired from Sigma, and 1-propanol, methanol and acetonitrile from Panreac. Cetyltrimethylammonium (CTAB) and tetradecyltrimethyl ammonium (TTAB) were purchased from Sigma.

All solutions were filtered through a 0.20- μ m syringe filter (Millipore, Billerica, MA, USA) before injection into the capillary. Milli-Q water of 18.2 M Ω cm resistivity was used throughout (Millipore).

The samples analysed were taken from the brewing process of an extra beer (beer with an original gravity (OG), i.e. the gravity of the wort before fermentation, of 1.05579 g mL⁻¹ and an alcohol content of 6.4% (v/v)): cold wort (sample 1), fermented wort (sample 2), matured and stored wort (sample 3), filtered wort (sample 4) and a bottled extra beer, i.e. the final product (sample 5) [45].

CE systems

A Beckman 5500 CE was used (Beckman Instrument, Inc., Fullerton, CA, USA) for developing the method with the

commercial (LIF) system. The system comprises a 0- to 30-kV high-voltage built in power supply, equipped with a LIF detector. In this case, an air-cooled argon ion laser (63.5 cm × 26.3 cm × 36.0 cm) with a power output of 3 mW was used as excitation source (488 nm) and the electropherograms were recorded by monitoring the emission intensity at 520 nm. Capillaries (fused silica) used were purchased from Beckman and from Composite Metal Services (Worcester, UK) and both had an inner diameter (i.d.) of 75 μm, a total length of 57 cm and an effective separation length of 50 cm. The part of the capillary where separation takes place was kept at a constant temperature (25 °C) by immersion in a cooling liquid (Beckman) circulating in the cartridge with a detection window of 100 μm × 200 μm. Data acquisition and processing were carried out with GOLD software installed in a personal computer.

With regard to the homemade (LED) system, a Prince CE system (Prince Technologies, Emmen, The Netherlands) was used with the same capillaries mentioned before (same origin and length). The high voltage is achieved with the system's 0- to 30-kV power supply. Unfortunately, temperature can not be controlled in this equipment.

A LS-450 Blue-LED Pulsed Light Source (Ocean Optics, Duiven, The Netherlands) equipped with a 470-nm LED with continuous power output of 50 μW, emission between 430 and 490 nm with maximum at 470 nm, and a low-pass filter at 500 nm was used as excitation source. Its dimensions are 0.90 cm × 0.50 cm × 0.32 cm.

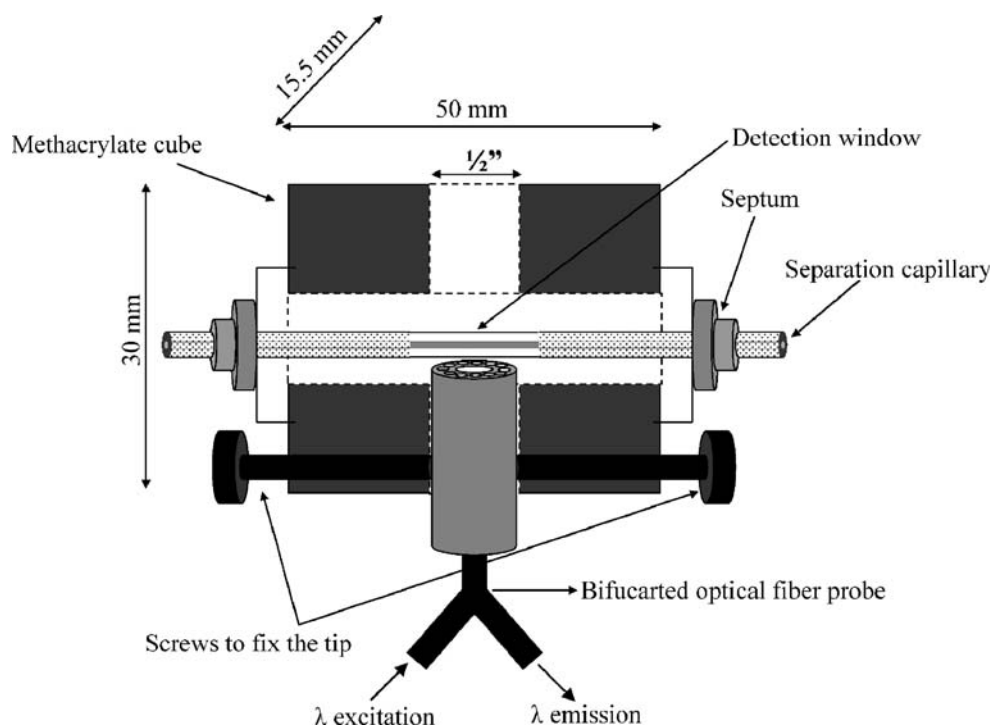
A 1/2" Industrial Fluorescence Probe (Avantes Inc., Broomfield, CO, USA) was used to focus the light emitted

by the LED to the capillary and also to collect the fluorescence emission from the capillary to the detector. A branch of the probe which has 12 UV/VIS fibres of 200-μm external diameter (called the illumination branch) was connected via SMA-905 with the LS-450 Blue-LED. The other branch, which is equipped with a 600-μm external diameter fibre and is called the detection branch, was also connected via SMA-905 with the charge-coupled device (CCD) spectrometer. The end of the probe consists of a stainless steel cylinder, 1/2" diameter, containing 10-mm-diameter × 1-mm-thick sapphire windows with anti-reflection coating and the 12 illuminating 200-μm fibre round the single 600-μm fibre which is in the middle of the tip.

The fibre optic spectrometer AvaSpec-2048 (Avantes) is designed with a 2,048-pixel CCD detector array. Avasoft-Full software controlled the spectrometer and saved the emission spectra. The software also permits the recording of 8 different time-drive functions simultaneously, thus permitting the recording of the emission intensity at 8 different wavelengths versus time, simultaneously, or 7 wavelengths and a complete emission spectrum versus time, etc.

An optimum alignment of the probe and capillary was obtained by means of a homemade detection cell in which no focussing optics was necessary (see Fig. 1). This simple device consists of a T-style detection cell similar to the cell proposed by Yang and Guan [37]. Two 1/2"-diameter channels were perforated at 90° in a 50 × 30 × 15.5-mm piece of black methacrylate. Two septums were fixed to maintain the correct position of the capillary in the middle

Fig. 1 Cross-sectional diagram of the homemade detection cell used in the homemade (LED) system



of the 1/2" channel. A detection window (about 1-cm length) was formed in the capillary by burning off the polyimide coating and this window was placed in front of the probe, which was placed at 90° to the capillary.

One of the more important parameters to take into account in the design of a detection cell is the distance between the tip of the probe and the capillary. By fixing the position of the probe with a screw at 0.13 mm from the capillary, the best signal/noise rate was achieved for a pressure injection of 5 s of FITC 1.0×10^{-6} mol L⁻¹ in a 50 mmol L⁻¹ sodium borate (pH 8.3) buffer (20 kV).

Electrophoretic methods

The capillary conditioning and washing protocol were identical for both methods developed with the two devices: before first use, a new capillary was rinsed with 0.2 mol L⁻¹ NaOH for 15 min, Milli-Q water for 5 min, followed by a 30-min rinse with the running buffer. Between consecutive injections the capillary was only conditioned with 0.2 mol L⁻¹ NaOH 3 min, water 2 min and buffer 5 min, but when the pH or the nature of the buffer was changed, before first injection the conditioning time for buffer increased to 10 min. This conditioning method was used to obtain reproducible migration times [46].

The derivatization procedure for FITC-labelled amines and amino acids was described by our research group in a previous paper [47] in which the parameters that affect the FITC-labelled aminated compounds were described and optimised. The procedure comprises the use of 495 µL 0.2 mol L⁻¹ carbonate buffer (pH 9), 1,000 µL FITC solution (1×10^{-2} mol L⁻¹) and 1,000 µL acetone mixed with 800 µL of a mixture of amines and amino acids at different concentrations and doubly deionised water to dilute to 5 mL (in a test tube). This solution was put into a thermostatic bath for 2 h at 50 °C and 2 mL of the resulting solution was diluted to a final volume of 10 mL with doubly deionised water before the analysis into the commercial (LIF) and homemade (LED) systems.

Separations were performed in both methods in coated fused silica capillaries of 75-µm i.d. and a total length of 57 cm (50 cm to the detector) with a semipermanent polication (HDB). In both cases the running buffer was 50 mmol L⁻¹ sodium borate (pH 9.3) with HDB (0.001% w/v) and 20% 2-propanol. Samples were injected hydrodynamically for 12 s at 3,438.9 Pa. The voltage applied was -28 kV in both CE methods, which results in a current of -98 µA. The detection was carried out in both CE systems at 520 nm.

Sample preparation

Sample preparation comprised degassing the beer samples by ultrasonication for 5 min before derivatization. The

analytical procedure for the sample derivatization was the same as we used for the standards mixture, i.e. 800 µL of each sample (except for extra beer for which 1,500 µL was taken) were mixed with the rest of the solutions (see the derivatization protocol) and placed into the thermostatic bath at 50 °C for 2 h. After the derivatization procedure the samples were passed through a 0.20-µm membrane filter prior to injection.

Results and discussion

FITC reacts with primary amines and amino acids to form a well-known fluorescence derivative with an acid group. Therefore, when basic pH is used in the electrophoretic medium, the compounds are negatively charged and their electrophoretic mobilities are opposite to electroosmosis. Under these conditions migration times of anionic compounds are relatively long if a capillary zone electrophoresis (CZE) or micellar electrokinetic chromatography (MEKC) methodology are used.

The migration times are reduced by reversing the electroosmotic flow (EOF) according to a principle known as co-electroosmotic CE. A negative power supply causes anionic compounds to migrate in the same direction as the EOF, resulting in fast analyses. The EOF is usually reversed by coating the capillary inner surface with a dynamic coating based on hemimicelles formed by cationic surfactants, such as HDB.

The instrumental and experimental conditions were carefully studied in order to obtain the best sensitivity and resolution among the analytes under study in these co-electroosmotic CE methodologies. These optimisation procedures are explained below.

Commercial (LIF) system

Method development

The effect of pH on the reversed EOF and resolution of the peaks was studied under the following electrophoretic conditions: 30 mmol L⁻¹ sodium borate buffer, 0.001% HDB and 15% 2-propanol (without this organic solvent no resolution was achieved at all); -25 kV and 12 s of hydrodynamic injection. The range of pH studied was 8.5–10.5 and it was observed that the separation of the analytes improved when the pH value increased until pH 9.3; higher pH values worsened resolution and led to longer analysis times. Therefore, pH 9.3 was selected.

Three different buffers were tested: sodium borate, CAPSO and sodium phosphate. Results showed that among the buffers tested, sodium borate gave the best separation plus a satisfactory analysis time. Hence,

subsequent experiments were performed with sodium borate at pH 9.3.

The concentration of the buffer has a major influence on electroosmotic flow and current produced in the capillary and hence on the resolution. That influence was investigated by varying the borate buffer concentration from 30 to 60 mmol L⁻¹ (other conditions: buffer pH 9.3, 0.001% HDB and 15% 2-propanol; -25 kV and 12-s injection). The results are depicted in Fig. 2. As can be seen, when buffer concentration increases from 30 to 50 mmol L⁻¹ the maximum resolution is achieved. With 50 mmol L⁻¹ buffer concentration the glycine, alanine and methylamine (peaks 1–3 in the electropherogram of Fig. 2) were completely resolved and minimum overlapping was found.

To investigate the influence of the surfactant chain length on the development of the EOF, three different modifiers, CTAB, TTAB and HDB, were added to the running buffer at several concentrations. All three surfactants can cause flow reversal in a single step, which is in accordance with a single transition adsorption isotherm [48]. The formation of hemimicelles and the stability of the bilayer assembly are directly related to the surfactant structural features, as ionic strength and solvation characteristics of the medium are kept constant. The best resolution was obtained when HDB was used, so we can conclude that the longer the chain length of the surfactant the higher resolution achieved. The concentration range studied was from 0.0001% to 0.02% with the best result at 0.001% (other conditions: 50 mmol L⁻¹ sodium borate at pH 9.3, 15% 2-propanol; -25 kV and 12-s injection). We also observed that this is not a critical parameter due to the fact that once the charged surface is saturated by hemimicelles and the flow has been inverted, an increase in surfactant concentration in the bulk has no effect on the extent of adsorption at the surface, and the flow magnitude remains practically constant.

The last experimental variable optimised was the organic solvent added to the buffer. 2-Propanol was used for preliminary studies of the analytical conditions because owing to our experience with this methodology it was well known that not enough resolution was achieved without this additive. The effect of this addition is to improve selectivity and separation efficiency by reducing the interaction between the analytes and the aliphatic chains of the osmotic modifiers. The separation time was often increased when high solvent concentrations were used which was due to a higher viscosity and reduction of the zeta potential. Different organic solvents such as methanol, acetonitrile, 2-propanol and 1-propanol were tested, with the best results obtained with 2-propanol (viscosity = 2.22 cP). A 2-propanol concentration ranging from 15 to 30% was studied, and the best resolution was obtained at a concentration equal to 20%, for which the overlaps between

tyramine/hexylamine and putrescine/cadaverine disappeared (other conditions: 50 mmol L⁻¹ sodium borate at pH 9.3, 0.001% HDB; -25 kV and 12-s injection).

When the voltage was increased from -15 to -30 kV (other conditions: 50 mmol L⁻¹ sodium borate at pH 9.3, 0.001% HDB and 20% 2-propanol; 12-s injection), the optimum electropherogram occurred at -28 kV, because some overlaps were observed between glycine and alanine, cadaverine and 1,6-hexanodiamine at -30 kV. Besides, higher values of voltage were not attractive, because longer capillary conditioning and washing times were necessary to avoid problems associated with the establishment of the current inside the capillary.

The influence of hydrodynamic injection time was studied in the range from 4 to 14 s (other conditions: 50 mmol L⁻¹ sodium borate at pH 9.3, 0.001% HDB and 20% 2-propanol; -28 kV), obtaining good sensitivity and resolution using 12 s (3,438.9 Pa).

A typical electropherogram in the commercial (LIF) device using the optimised conditions for the mixture of 13 labelled aminated compounds is shown in Fig. 3. As can be seen, dimethylamine and ethylamine cannot be quantified because they overlap; histamine cannot be quantified because it has the same migration time as a residual peak of the blank.

Analytical characteristics

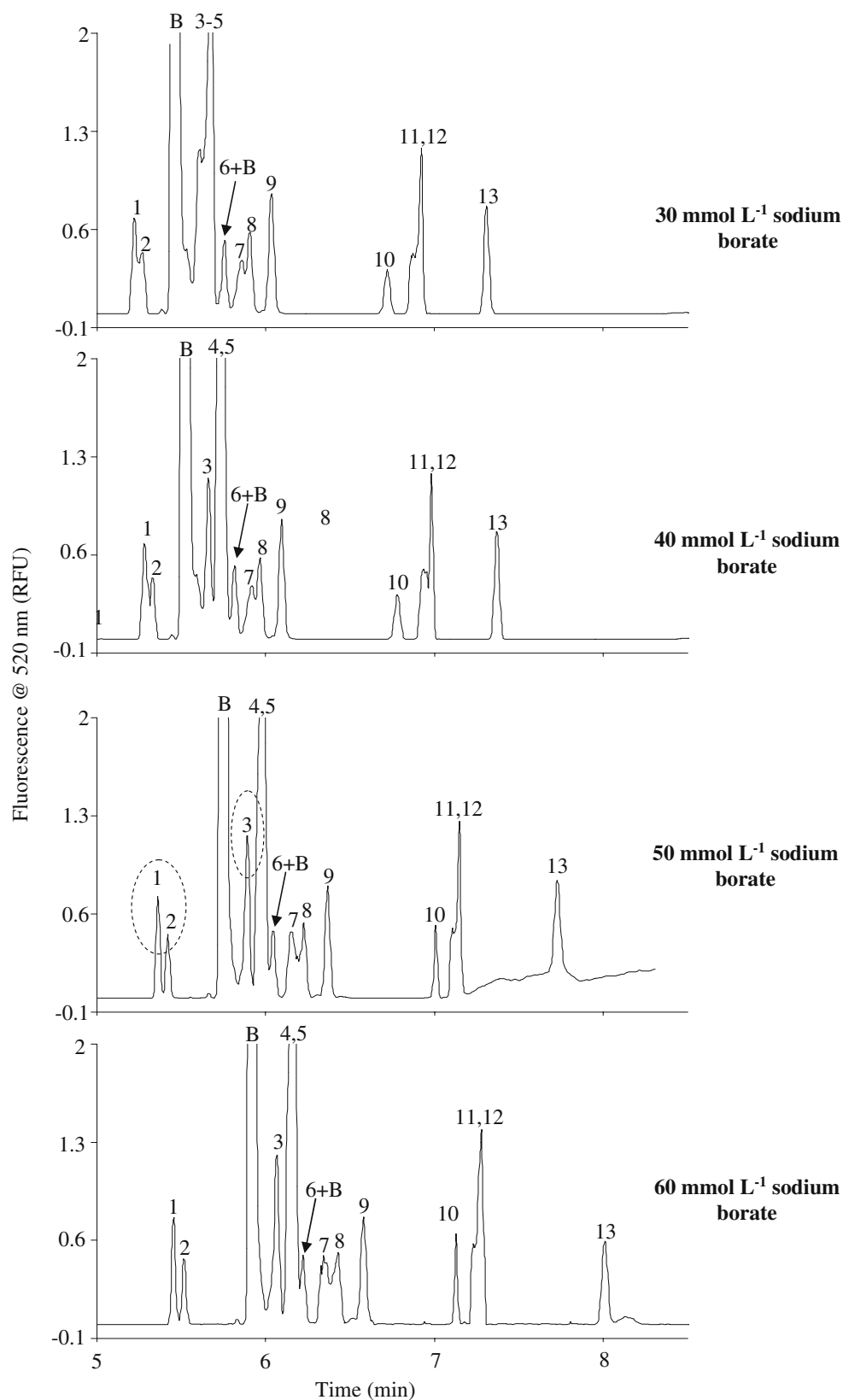
After the development of the method for the rapid analysis of aminated compounds in the commercial (LIF) system, their analytical characteristics were examined. The results are shown in Table 1.

An evaluation of the sensitivity was made by determining the values of the LOD calculated in two ways: on one hand, from the peak area on the basis of $3\sigma/b$, where σ is the standard deviation of the blank (largest deviation of detector signal from baseline measured in a section of about 300 points in the absence of analyte) and b is the intercept of every calibration equation; on the other hand, LODs were calculated from the peak height based on a signal-to-noise ratio of 3. Practically the same results were achieved in both ways, so in Table 1 only the LODs calculated from the areas are shown.

The linearity study showed that linear relationships with good correlation in all cases (correlation coefficients (r) >0.99) were obtained for the variation of the peak area as a function of the concentration of the aminated compounds, using six standard solutions (each solution was injected twice). The calibration ranges shown in Table 1 were established by taking into account the concentration of these aminated compounds in real brewing samples.

The precision of the method described was measured as repeatability and reproducibility. Precision is one of the

Fig. 2 Effect of increasing ionic strength (sodium borate) on the resolution of aminated compounds in the commercial (LIF) system: 1 glycine ($0.32 \mu\text{g mL}^{-1}$), 2 alanine ($0.32 \mu\text{g mL}^{-1}$), 3 methylamine ($1.02 \mu\text{g mL}^{-1}$), 4 dimethylamine ($1.16 \mu\text{g mL}^{-1}$), 5 ethylamine ($1.5 \mu\text{g mL}^{-1}$), 6 histamine ($0.32 \mu\text{g mL}^{-1}$), 7 tyramine ($0.32 \mu\text{g mL}^{-1}$), 8 hexylamine ($0.32 \mu\text{g mL}^{-1}$), 9 dibutylamine ($0.8 \mu\text{g mL}^{-1}$), 10 putrescine ($5.12 \mu\text{g mL}^{-1}$), 11 cadaverine ($1.6 \mu\text{g mL}^{-1}$), 12 1,6-hexanodiamine ($2.72 \mu\text{g mL}^{-1}$), 13 agmatine ($0.86 \mu\text{g mL}^{-1}$), B blank. Experimental conditions: sodium borate pH 9.3, 0.001% HDB, 15% 2-propanol, fused silica capillary ($50 \text{ cm} \times 75\text{-}\mu\text{m i.d.}$), running voltage -28 kV , injection 12 s ($3,438.9 \text{ Pa}$), temperature $25 \text{ }^\circ\text{C}$, excitation 488 nm , detection, 520 nm . *Circled peaks* are resolved during this optimisation



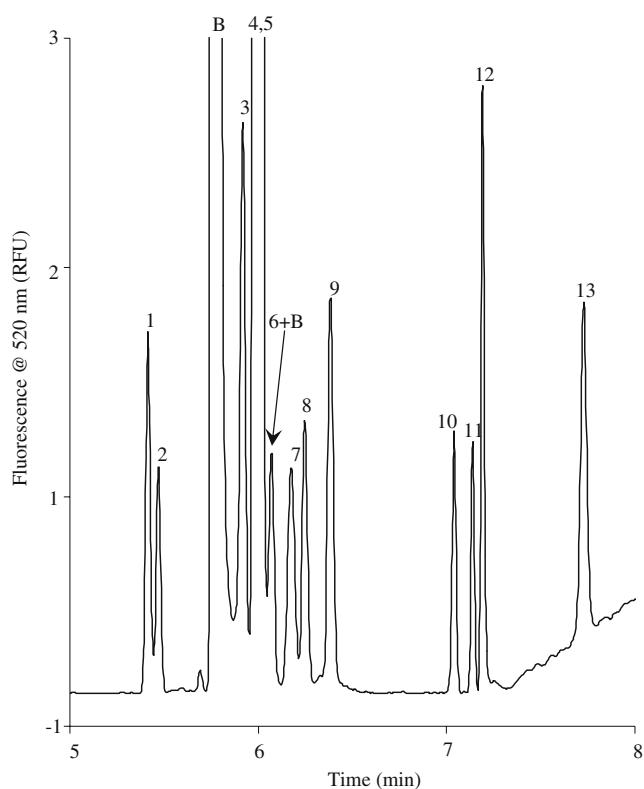


Fig. 3 Separation of the standard mixture of derivatized aminated compounds in the commercial (LIF) device (same concentrations as in Fig. 2). Experimental conditions: 50 mmol L⁻¹ sodium borate pH 9.3, 0.001% HDB, 20% 2-propanol; other separation conditions as in Fig. 2

most important criteria for evaluating the analytical method performance, and its numerical value is the relative standard deviation (RSD). The intra- and inter-day repeatability in the migration times and peak areas was determined as the RSD obtained for six consecutive injections of each aminated compound at an intermediate concentration value of the calibration curve, carried out within the same day and on three different days. Table 1 shows that acceptable levels of precision were obtained for the developed method in terms of repeatability, since in all cases RSDs calculated were lower than 9.7%. RSDs for migration times are always lower than those for peak areas, as well as within-day RSDs which are lower than between-day values. The reproducibility of the method was measured as the RSD obtained for three consecutive injections with two capillaries from two different suppliers, with two different technicians on two different days ($n=24$). Acceptable RSD values were obtained for migration times (RSD < 1%).

Applicability to brewing samples

When the developed method in the commercial (LIF) system was applied to the five brewing samples mentioned in “Chemicals and samples”, the identification of the 13 aminated compounds and the quantification of nine of them

were carried out in less than 8 min. The identification and confirmation of the peaks in beer samples was carried out by comparing migration times, and by spiking the samples with standard compounds at several concentration levels to clarify their identifications. Figure 4 shows the electropherograms obtained for these samples in this commercial (LIF) device. They have different scales due to the differences in the concentration of the analytes in each analysed sample. The analytical procedure for sample treatment was described in the “Electrophoretic methods”. Table 2 lists the content of the analytes studied in these samples for 5 injections of each sample. The RSD for all the samples was lower than 5%, demonstrating the good method precision.

Histamine and 1,6-hexanodiamine could not be quantified because the former compound overlaps with an FITC peak and the latter compound has the same migration time as an unknown compound present in these samples.

In order to study the accuracy of the method, the standard addition methodology (SAM) [49] was applied to the brewing samples. The parallelism between the slopes of the standard addition curves and the slopes of the calibration curves shows the absence of a matrix effect. Standard addition equations, with seven standard solutions injected twice, are detailed in Table 3. The statistic for slopes tabulated was 2.819 ($df=22$, $\alpha=0.01$). The statistics for slopes calculated, which are shown in Table 3, are in all cases lower than the tabulated value, so we can conclude that the slopes are essentially the same. Finally, recovery percentages are acceptable for this CE method (89.4–114.9%).

Homemade (LED) system

Method development

Here, the experimental and instrumental parameters were optimised with the same protocol as the method developed in the commercial (LIF) system, except for integration time and average of the CCD, which did not exist in the commercial device. The enormous influence of the organic solvent on the resolution can be seen in Fig. 5. The separation time increases with increasing 2-propanol, as does the resolution, up to 20%, where the maximum separation between peaks is achieved.

The effect of the integration time is related to the LOD, which was calculated according to the recommended IUPAC procedure [50]. An increase of the integration time between 10 and 150 ms (other conditions: 50 mmol L⁻¹ sodium borate at pH 9.3, 0.001% HDB and 20% 2-propanol; -28 kV and 12-s injection), improves the LOD in sevenfold. When the integration time is higher than 150 ms the LOD is practically constant. Integration times higher than 250 ms cannot be used due to saturation of the CCD detector. Thus, an integration time of 200 ms was set.

Table 1 Analytical characteristics of both methods developed in the commercial (LIF) and homemade (LED) systems

Analytes	CE system	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Calibration equation ^a	<i>r</i>	Calibration range ($\mu\text{g L}^{-1}$) ^b	Intra-day repeatability ^c		Inter-day repeatability		Reproducibility ^f	
						RSD _t (%) ^d	RSD _A (%) ^e	RSD _t (%)	RSD _A (%)	RSD _t (%)	RSD _A (%)
Glycine	Commercial	75	$A=0.021c+5.5$	0.997	49–4,000	0.49	4.83	0.65	4.92	0.66	4.81
Alanine	Commercial	65	$A=0.024c+2.2$	0.997	60–4,000	0.48	5.60	0.61	5.86	0.70	4.96
Methylamine	Commercial	16	$A=0.098c+7.4$	0.997	53–4,000	0.51	9.27	0.73	9.32	0.89	9.98
	Homemade	29	$A=5,482.3c-447.1$	0.999	97–4,000	2.69	3.12	3.47	3.84	3.98	5.14
Tyramine	Commercial	56	$A=0.028c+8.4$	0.996	152–1,000	0.47	1.45	0.86	2.36	0.98	3.07
Hexylamine	Commercial	68	$A=0.023c+6.8$	0.997	211–4,000	0.45	9.15	0.69	9.28	0.63	9.61
Dibutylamine	Commercial	87	$A=0.018c+6.5$	0.993	151–6,000	0.49	4.38	0.82	4.67	0.91	5.76
Putrescine	Commercial	261	$A=0.006c-2.5$	0.994	753–2,500	0.51	6.02	0.75	6.35	0.61	7.80
Cadaverine	Commercial	224	$A=0.007c+1.2$	0.996	151–1,200	0.37	9.58	0.68	9.63	0.33	9.86
1,6-Hexanodiamine	Commercial	392	$A=0.004c-2.3$	0.994	1078–3,400	0.32	6.03	0.54	6.61	0.21	7.19
Agmatine	Commercial	47	$A=0.033c+5.6$	0.998	142–1,200	0.76	3.77	0.83	3.88	0.75	4.25
	Homemade	78	$A=2,044.2c-526.7$	0.998	259–1,200	2.37	2.84	3.22	4.01	3.12	5.01

^a *A* represents peak area (time \times relative fluorescence units); *c* means analyte concentration ($\mu\text{g L}^{-1}$) for six points ($n=2$)

^b From the quantification limit

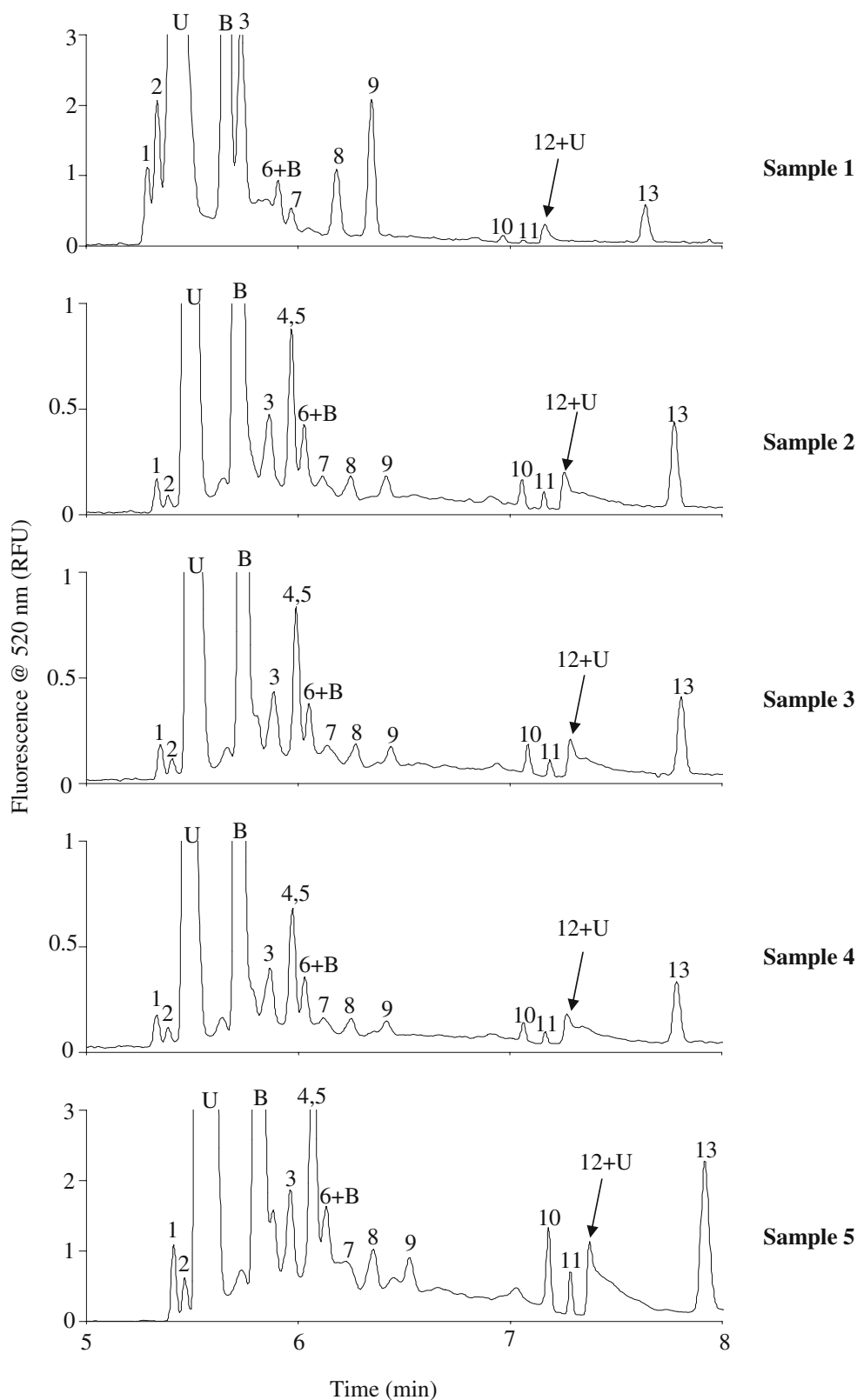
^c Measured from six consecutive injection of each analyte within the same day (intra-) and on three different days (inter-).

^d For migration times corresponding to each analyte

^e For peak areas corresponding to each analyte

^f Measured from three consecutive injection with two different capillaries, two different technicians and on two different days.

Fig. 4 Electropherograms of samples obtained during the brewing process under the commercial (LIF) system. Experimental conditions as in Fig. 3. *Sample 1* cold wort, *sample 2* fermented wort, *sample 3* matured and stored wort, *sample 4* filtered wort, *sample 5* final product, *B* blank, *U* unknown peak



With regard to the average value, it has to be mentioned that it does not affect the LOD. Increasing average from 5 to 25 (other conditions: 50 mmol L⁻¹ sodium borate at pH 9.3, 0.001% HDB and 20% 2-propanol; -28 kV and 12-s

injection; 200-ms integration time), decreases the sharpness of the peaks and worsens the resolution; therefore, 5 was chosen as the average optimum value to keep an appropriate number of points to draw the electrophoretic peaks

Table 2 Concentration of aminated compounds during brewing process of an extra beer with the commercial (LIF) and homemade (LED) systems

Analytes	CE system	Sample 1 (mg L ⁻¹)	Sample 2 (mg L ⁻¹)	Sample 3 (mg L ⁻¹)	Sample 4 (mg L ⁻¹)	Sample 5 (mg L ⁻¹)
Glycine	Commercial	44.82	2.25	2.25	2.21	1.60
Alanine	Commercial	74.67	1.90	1.90	1.90	1.13
Methylamine	Commercial	49.53	8.26	7.26	6.50	1.86
	Homemade	50.08	8.94	7.04	6.15	2.35
Tyramine	Commercial	9.82	4.15	4.14	4.15	nq
Hexylamine	Commercial	72.52	8.67	8.58	7.34	3.62
Dibutylamine	Commercial	90.17	13.43	9.83	6.37	4.22
Putrescine	Commercial	47.13	42.23	42.13	42.28	22.66
Cadaverine	Commercial	8.48	8.41	8.67	8.43	4.94
Agmatine	Commercial	19.17	13.51	11.68	8.85	4.55
	Homemade	20.04	14.39	13.81	8.99	4.51

nq not quantified

(integration time 200 ms × 5 averages means 1 point by 1 s, so approximately 26 points to draw a peak).

Therefore, the optimum chemical and instrumental conditions were: 50 mmol L⁻¹ sodium borate at pH 9.3, with 20% 2-propanol and 0.001% HDB; voltage applied -28 kV and 12 s of hydrodynamic injection; 200-ms integration time with an average of 5.

An optimum electropherogram for the mixture of aminated compounds studied and analysed with the homemade (LED) system is presented in Fig. 6. As can be seen, unfortunately only two of the compounds from the mixture (methylamine and agmatine) can be quantified because the rest of the overlaps are very difficult to resolve.

Analytical characteristics

The evaluation of the LODs and the linearity and precision study were carried out in the same way as in the commercial (LIF) system. See Table 1 with the obtained results.

LODs were only determined for the two analytes completely resolved, methylamine and agmatine, and in both cases, the values were 1.8 times worse than those

obtained with the laser system. Correlation coefficients were >0.99 for both calibration curves, showing good linearity.

The repeatability of the proposed method showed good values of RSDs for migration times as well as for peak areas (ca. 4%). The same tendency in the values of RSDs for migration times and for peak areas that appeared in the commercial (LIF) system is also found in the homemade (LED) device: lower values for migration times than for peak areas. Reproducibility gives acceptable RSD values, between 3–4% (for migration times).

Applicability to brewing samples

The same samples analysed with the commercial (LIF) device were also used to demonstrate the applicability of the method developed in the homemade (LED) system. Concentrations of methylamine and agmatine found in the brewing samples are summarised in Table 2. For five injections of each sample, RSD values between 0.95 and 3.04% were obtained, showing the good method precision.

The accuracy of the method was also studied with the standard addition methodology. As well as for laser system,

Table 3 Standard addition methodology for both fluorescence methods and recovery percentages

Analytes	CE system	Standard addition equation ^a	t _{cal} ^b	Recovery (%)
Glycine	Commercial	A=0.019c+13	0.234	114.5
Alanine	Commercial	A=0.019c+12.9	0.498	114.9
Methylamine	Commercial	A=0.135c+77.6	0.231	95.8
	Homemade	A=5,479.6c-340.2	0.552	89.6
Tyramine	Commercial	A=0.033c+22.5	0.510	113.4
Hexylamine	Commercial	A=0.031c+16.4	0.728	89.7
Dibutylamine	Commercial	A=0.019c+10.8	0.311	95.1
Putrescine	Commercial	A=0.007c+5.2	0.348	123.8
Cadaverine	Commercial	A=0.008c+5.4	0.323	112.3
	Commercial	A=0.032c+17.16	0.162	89.4
Agmatine	Commercial	A=2,040c-432.1	0.481	95.2
	Homemade			

^a A represents peak area (time × relative fluorescence units); c means analyte concentration (μg L⁻¹) for seven points (n=2)

^b df=22, α=0.01; t_{tab}=2.819

Fig. 5 Effects of % of 2-propanol on the separation of aminated compounds in the homemade (LED) device (double concentration that in the LIF-CE determination). Experimental conditions: 40 mmol L⁻¹ sodium borate pH 9.3, 0.001% HDB; fused silica capillary (50 cm×75- μ m i.d.), running voltage -20 kV, injection 12 s (3,438.9 Pa), temperature is not controlled, excitation 470 nm, detection 520 nm with integration time of 200 ms and average of 5

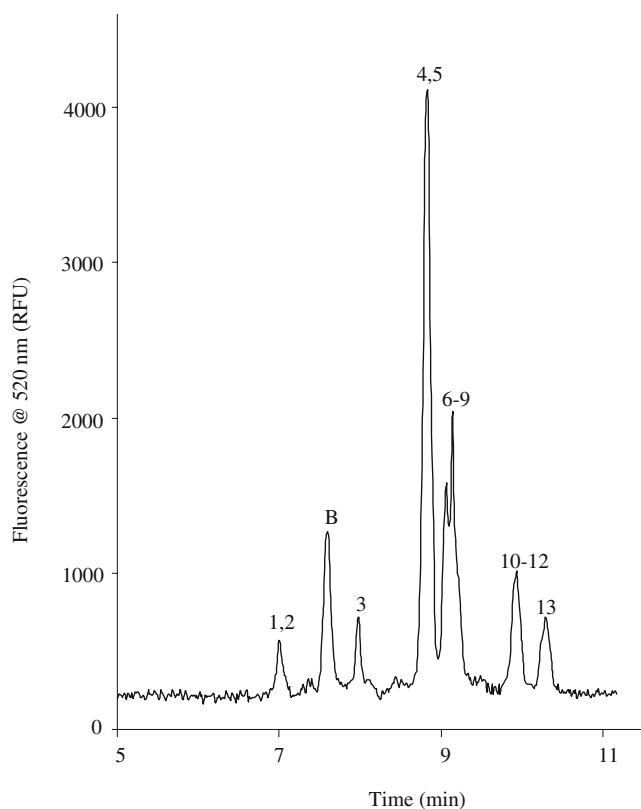
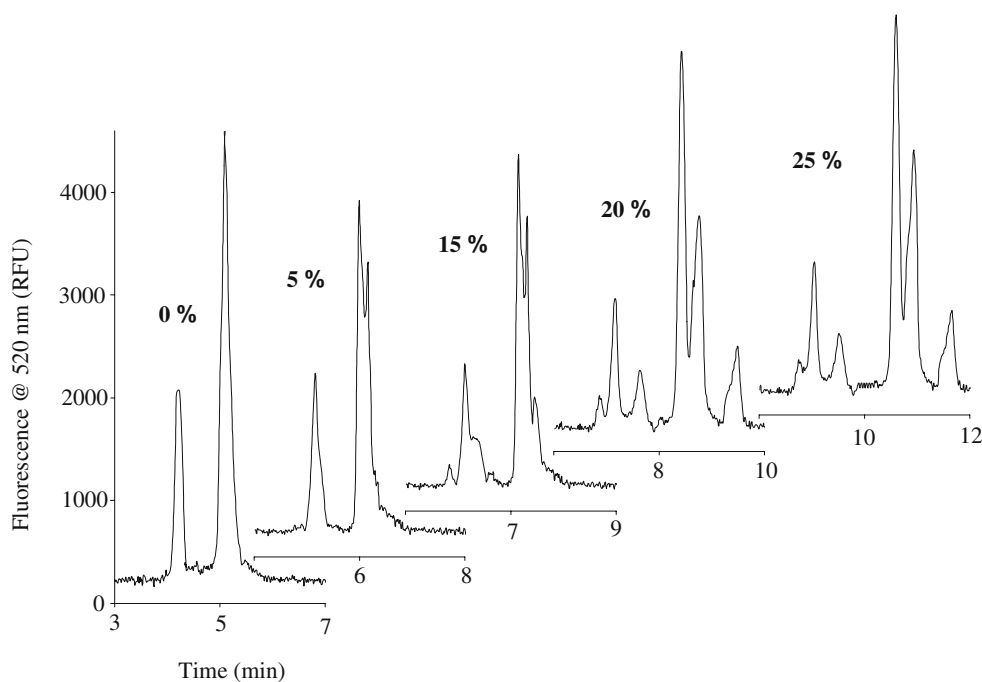


Fig. 6 Optimum analysis of the mixture of aminated compounds studied with the homemade (LED) device: 1 glycine (0.64 μ g mL⁻¹), 2 alanine (0.64 μ g mL⁻¹), 3 methylamine (2.04 μ g mL⁻¹), 4 dimethylamine (2.32 μ g mL⁻¹), 5 ethylamine (3 μ g mL⁻¹), 6 histamine (0.64 μ g mL⁻¹), 7 tyramine (0.64 μ g mL⁻¹), 8 hexylamine (0.64 μ g mL⁻¹), 9 dibutylamine (1.6 μ g mL⁻¹), 10 putrescine (10.24 μ g mL⁻¹), 11 cadaverine (3.2 μ g mL⁻¹), 12 1,6-hexanodiamine (5.44 μ g mL⁻¹), 13 agmatine (1.72 μ g mL⁻¹), B blank. Experimental conditions as in Fig. 5, except for 50 mmol L⁻¹ sodium borate

the statistics for slopes calculated were lower than the tabulated value (see Table 3).

Comparative study

Figures 3 and 6 show the optimum electropherograms for both methods in both instruments. The lack of resolution achieved with the homemade (LED) system is clear, since only two of the analytes are completely resolved. The fact that the temperature cannot be controlled in this system is a huge disadvantage in achieving better resolution and the same migration times as in the commercial (LIF) device. In addition, the detection windows are very different in both cases. In the commercial (LIF) system, it is perfectly established as 100×200 μ m by means of a plastic washer incorporated into the capillary cartridge, whereas in homemade (LED) system there is no device in the detection cell which allows us to control the detection window. Thus, this window is approximately 3 times wider (45 mm²) than in the commercial instrument (15 mm²). We think that this is the main reason why poorer resolution is achieved with the homemade (LED) system. Our future work will therefore focus on limiting this detection window area in order to afford a better homemade (LED) setup with proper optics, which will make it possible to achieve less band broadening and better LODs. We are also trying to develop a thermostating device for the homemade (LED) system to minimize the differences in migration times.

If the shape of the blank peak (FITC) is analysed in both electropherograms it can be seen that the peak obtained with the homemade system is considerably less intense than

that obtained with the commercial system due to the lower power of the light source (laser versus LED) and to the better-fit excitation wavelength of the laser, 488 nm versus 470 nm of the LED source (FITC has its maximum emission intensity at 492 nm).

The commercial (LIF) system has the best LODs, obtaining $16 \mu\text{g L}^{-1}$ for methylamine. However, it has to be pointed out that those achieved with the homemade (LED) system are very competitive (e.g. $28.9 \mu\text{g L}^{-1}$ for methylamine) if we take into account the lower power of the LED against the laser.

With regard to the comparison of the precision of both methods, the laser system has better repeatability in terms of migration times (intra- and inter-), whereas in terms of peak areas both methods are very similar. The poorer repeatabilities stem from the absence of temperature control in the homemade (LED) system; the migration times are dependent on the viscosity of the buffer solution, which has an important influence on the linear velocity of the EOF [51, 52]. Reproducibility was better in the commercial (LIF) system again, with an RSD of 0.24% for cadaverine compared to 3.05% for agmatine in the homemade (LED) device. So, in terms of repeatability and reproducibility, even when the method developed in the commercial (LIF) system operated using the optimised parameters, it is very closely followed by the one developed in the homemade (LED) device with good percentages.

Another important aspect, such as cost, can be compared. Taking into account the cost of the components of both devices, the total cost for the homemade (LED) system is more than 3 times cheaper than the commercial (LIF) one.

Portability and miniaturization of LIF systems are highly desirable for the production of portable systems suitable for field applications. However, conventional lasers, as discussed in the "Introduction", are relatively expensive, bulky, and have rather limited lifetime, and are not suitable for integration into chip-based microdevices. The availability of solid-state laser diodes has somewhat alleviated these limitations; however, still not enough to achieve these goals. Thus, LEDs are being exploited in microanalytical CE systems, providing excellent prospects for detector integration and miniaturization [27–29].

Another advantage of the LED devices is its huge versatility to measure more than one emission wavelength simultaneously; it also permits the recording of the full emission spectra, providing 3D electroferograms which show intensity, emission spectra and migration time in the same representation and permit the measurement of phosphorescence due to LED being pulsed.

Despite all these potential advantages of the homemade (LED) system, the superiority of the commercial system, in terms of resolution and sensitivity, must be recognized.

Conclusions

Two induced-fluorimetric methods were developed: one in a commercial instrument with an argon ion laser as excitation source; the other in a homemade device with a cheap LED as light source, fibre optics and a detection cell built in our laboratory. Both methods have been applied to determine aminated compounds in brewing samples. Resolution achieved with the homemade instrument was much poorer than that with the commercial device, but it is easy to understand why if we take into account that the detection window in the LED system is about 3 times wider than in the laser, and there is no refrigeration either.

Although the LODs of FITC-aminated compounds determined with the homemade (LED) system were a factor of 1.8 worse than those obtained with the laser system, the homemade device has enormous advantages, such as low cost, ease of use and high potential for miniaturization. In order to compensate the above-mentioned deficiencies, improvements in the design of the detection cell, development of a thermostating system and the use of LEDs with higher emission efficiency will be considered as future directions.

Although the homemade (LED) system is presented as low-cost in comparison with the laser, the difference in cost could not be big enough to outweigh the loss in performance. The homemade (LED) system is not expected to displace the commercial (LIF) one, but offers another possibility and cheaper way to solve simple analytical problems. The final choice of the system will be depend on the complexity of the sample and on the analytical requirements.

Acknowledgements We gratefully acknowledge to Ministry of Education and Science for the financial support of two FPU grants (Ref. AP2002-1033 and AP2002-1043) and to Ministry of Science and Technology for the Projects CTQ2005-01914/BQU and PETRI N° 95-809.OP.

References

1. Olechno JD, Tso JMY, Thayer J (1991) *Am Lab* 23:59
2. Monnig CA, Kennedy RT (1994) *Anal Chem* 66:R280–R314
3. Landers JP (1997) (ed) *Handbook of capillary electrophoresis*. CRC Press
4. Khaleedi MG (1998) (ed) *High performance capillary electrophoresis, theory, techniques and applications*. Wiley, New York
5. Blanc et al (1997) *Analytical instrumentation handbook*. Marcel Dekker, UK
6. Fernández-Gutiérrez A, Segura-Carretero A (2005) (eds) *Electroforesis capilar: aproximación según la técnica de detección*. Universidad de Granada, Granada
7. Timerbaev AR (2004) *Electrophoresis* 25:4008–4031
8. Juan-García A, Font G, Pico Y (2005) *J Sep Sci* 28:793–812
9. Shihabi ZK (2000) *J Liq Chromatogr Relat Technol* 23:79–95
10. Altria KD, Elder D (2004) *J Chromatogr A* 1023:1–14

11. Pico Y, Rodríguez R, Manes J (2003) *TRAC* 22:133–151
12. Chen D, Adelhelm K, Cheng XL, Dovichi NJ (1994) *Analyst* 119:349–352
13. MacTaylor CE, Ewing AG (1997) *Electrophoresis* 18:2279–2290
14. Weinberger R (1993) (ed) *Practical capillary electrophoresis*. Academic Press, Boston
15. Kulmala S, Suomi J (2003) *Anal Chim Acta* 500:21–69
16. Gassman E, Kuo JE, Zare RN (1985) *Science* 230:813–815
17. Cheng YF, Dovichi NJ (1988) *Science* 242:562–564
18. Kašička V (2001) *Electrophoresis* 22:4139–4162
19. Ummadi M, Weimer BC (2002) *J Chromatogr A* 964:243–253
20. Militopoulou M, Lecomte C, Bayle C, Couderc F, Karamanos NK (2003) *Biomed Chromatogr* 17:39–41
21. Lin YW, Chiu TC, Chang HT (2003) *J Chromatogr B* 793:37–48
22. Yang BC, Guan YF, Tan F (2004) *Prog Chem* 16:871–878
23. Yang XH, Wang XC, Zhang XM (2005) *Anal Chim Acta* 549:81–87
24. Wang QG, Luo G, Wang YM, Yeung WSB (2000) *Anal Lett* 33:589–602
25. Melanson JE, Boulet CA, Lucy CA (2001) *Anal Chem* 73:1809–1813
26. Melanson JE, Lucy CA (2002) *Electrophoresis* 23:1689–1694
27. Johns C, Macka M, Haddad PR (2004) *Electrophoresis* 25:3145–3152
28. Kuo JS, Kuyper CL, Allen PB, Fiorini GS, Chiu DT (2004) *Electrophoresis* 25:3796–3804
29. Webster JR, Burns MA, Burke DT, Mastrangelo CH (2001) *Anal Chem* 73:1622–1626
30. Dasgupta PK, Eom IY, Morris KJ, Li JZ (2003) *Anal Chim Acta* 500:337–364
31. Tong W, Yeung ES (1995) *J Chromatogr A* 718:177
32. Dasgupta PK, Zhang GF, Li JZ, Boring CB, Jambunathan S, Al-Horr R (1999) *Anal Chem* 71:1400–1407
33. Su AK, Lin CH (2003) *J Chromatogr B* 785:39–46
34. Su AK, Chang YS, Lin CH (2004) *Talanta* 64:970–974
35. Hillebrand S, Schoffen JR, Mandaji M, Termignoni C, Grieneisen HPH, Kist TBL (2002) *Electrophoresis* 23:2445–2448
36. Chen SJ, Chen MJ, Chang HT (2003) *J Chromatogr A* 1017:215–224
37. Yang BC, Guan YF (2003) *Talanta* 59:509–514
38. Árraez-Román D, Fernández-Sánchez JF, Cortacero-Ramírez S, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A (2006) *Electrophoresis* 27:1776–1783
39. Loret S, Deloyer P, Dandriofosse G (2005) *Food Chem* 89:519–525
40. Kalac P, Krizek M (2003) *J Instit Brew* 109:123–128
41. Romero R, Bagur MG, Sánchez-Viñas M, Gázquez D (2003) *Anal Bioanal Chem* 376:162–167
42. Kalac P, savel J, Krizek M, Pelikánová T, Prokopová M (2002) *Food Chem* 79:431–434
43. Kovacs A, Simon-Sarkadi L, Ganzler K (1999) *J Chromatogr A* 836:305–313
44. Moret S, Conte LS (1996) *J Chromatogr A* 729:363–369
45. Cortacero-Ramírez S, Árraez-Román D, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A (2007) *Food Chem* 100:383–389
46. Faller T, Engelhardt H (1999) *J Chromatogr A* 853:83–94
47. Árraez-Román D, Segura-Carretero A, Cruces-Blanco C, Fernández-Gutiérrez A (2004) *Biomed Chromatogr* 18:422–426
48. Lucy CA, Underhill RS (1996) *Anal Chem* 68:300–305
49. Cuadros-Rodríguez L, García-Campaña A, Alés-Barrero F, Jiménez-Linares C, Román-Ceba M (1995) *J AOAC Int* 78:471–476
50. Curie LA (1995) *Pure Appl Chem* 67:1699–1724
51. Altria KD, Fabre H (1995) *Chromatographia* 40:313–320
52. Chen N, Wang L, Zhang Y (1993) *J Liq Chromatogr* 16:3609–3622

Simple luminescence detectors using a light-emitting diode or a Xe lamp, optical fiber and charge-coupled device, or photomultiplier for determining proteins in capillary electrophoresis: A critical comparison

Silvia Casado-Terrones, Jorge F. Fernández-Sánchez, Antonio Segura-Carretero *, Alberto Fernández-Gutiérrez *

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Granada, E-18071 Granada, Spain

Received 15 January 2007

Available online 23 February 2007

Abstract

The performance of two homemade fluorescence-induced capillary electrophoresis detectors, one based on light-emitting diode (LED) as the excitation source and a charge-coupled device (CCD) photodetector and the other based on a commercial luminescence spectrometer (Xe lamp) as the excitation source and a photomultiplier tube as a detector, were compared for the determination of fluorescent proteins R-phycoerythrin and B-phycoerythrin. Both devices use commercially available, reasonably priced optical components that can be used by nonexperts. After fine optimization of several optical and separation parameters in both devices, a zone capillary electrophoresis methodology was achieved with 50 mM borate buffer (pH 8.4) and 10 mM phytic acid for the determination of two phycobiliproteins. Detection limits of 0.50 and 0.64 $\mu\text{g/ml}$ for R-phycoerythrin and B-phycoerythrin, respectively, were achieved by using the LED-induced fluorescence capillary electrophoresis (LED-IF-CE) system, and corresponding detection limits of 2.73 and 2.16 $\mu\text{g/ml}$ were achieved by using the Xe lamp-IF-CE system. Analytical performance and other parameters, such as cost and potential to miniaturization, are compared for both devices.

© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Light-emitting diode-induced fluorescence; Xenon lamp; CCD detector; Photomultiplier; Capillary electrophoresis; Protein analysis; Native fluorescence detection; Phycobiliproteins

Capillary electrophoresis (CE)¹ has many advantages and has been proven to be one of the most powerful techniques for analyzing biological samples [1] and, more

precisely, for analyzing proteins [2,3]. Since the introduction of automated CE instrumentation during the late 1980s, the technique has allowed rapid identification of proteins with minimal technical input [2]. Thus, CE has become a mature technique for the analysis of biomolecules [3].

Today, many detection systems are being used in CE, including UV-visible (UV-Vis) absorption, fluorimetry, phosphorimetry, mass spectrometry, electrochemistry, conductivity, and nuclear magnetic resonance [4,5]. UV absorbance is the primary detection method in CE analysis of proteins [3]. Absorbance detection can be applied to all proteins and peptides and does not require derivatization of the analytes prior to injection. However, absorbance

* Corresponding authors. Fax: +34 958 249510.

E-mail addresses: ansegura@ugr.es (A. Segura-Carretero), albertof@ugr.es (A. Fernández-Gutiérrez).

¹ Abbreviations used: CE, capillary electrophoresis; UV-Vis, UV-visible; LIF, laser-induced fluorescence; PBP, phycobiliprotein; LED, light-emitting diode; NIR, near infrared; IR, infrared; IF, induced fluorescence; CCD, charge-coupled device; RPE, R-phycoerythrin; BPE, B-phycoerythrin; FITC, fluorescein isothiocyanate isomer I; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; PMT, photomultiplier tube; S/N, signal/noise; PE, phycoerythrin; PC, phycocyanin; APC, allophycocyanin; LOD, limit of detection; RSD, relative standard deviation.

detection suffers from high background noise and interference from other species [6].

Laser-induced fluorescence (LIF) is the most sensitive detection scheme in CE [3]. This method has been widely applied for the analysis of biomolecules [3]. In particular, it has been used to determine native fluorescence proteins such as phycobiliproteins (PBPs) [7,8]. However, for inherently fluorescent analytes, it is necessary to choose readily available lasers that can be matched to their spectral properties. In addition, conventional lasers are generally expensive, are relatively bulky, and have short lifetimes. In contrast, light-emitting diodes (LEDs) are reasonably priced and can be operated with battery power, so the output stability is significantly better than that of currently used laser. In addition, they have reasonably high intensity, small size, and long lifetimes. The concentrated, small, cool emitter they provide is ideal for miniature analytical devices [9–11]. In addition, LEDs at a variety of wavelengths in UV–Vis–near infrared (NIR) are commercially available, and one can easily choose suitable excitation wavelengths according to the properties of samples. Despite the multiple advantages of LEDs, the emission from LED sources is spatially incoherent and not monochromatic. When using LEDs as the excitation source for fluorimetric detection, considerable power loss may be expected due to failure to achieve proper focusing and obtain the required spectral output.

An alternative light source that may be used in the development of a fluorescence detector for CE is the Xe lamp. It provides light in the UV–Vis–infrared (IR) region with a very high intensity but no monochromaticity. Thus, it needs to be coupled with wavelength selectors such as filters and monochromators.

LED-induced fluorescence CE (LED-IF-CE) detectors have been used for determining peptides [12], riboflavin [13,14], dopamine and reserpine mixtures [15], agmatine [16], glutamic and aspartic acids [17], and D-alanine [18]. However, all of these LED-IF-CE detectors use plastic lenses or microscopes to focus the light from the LED to the capillary and/or to collect the fluorescence emission from the capillary to the detector (which usually is a photomultiplier). In addition, only one study that used an LED-IF detector for protein analysis by CE has been published [6]. It used a deep UV LED (280 nm) as an excitation source; this is expensive, needs a refrigeration system to be cooled down, and has a lifetime of only 100 h. To focus the light, it uses a set of three fused silica ball lenses and a photomultiplier as a detector. In addition, it uses a pinhole filter and a bandpass filter. The several components were mounted for the alignment of all the optical parts, and an A/D converter with a homemade LabView program was used to record the signals. Although the sensitivity of this device is comparable to that of pulsed UV lasers, the device is expensive and cannot be used by nonexperts. To our knowledge, no experimental setups have been developed by using a commercial fluorescence spectrometer as the fluorescence detector for detecting biomolecules.

It is not easy to focus the light into the capillary or to transport the emitted light to the detector, but the use of an optical fiber for transporting the excitation light and collecting the emission fluorescence makes the optical system compact, simple, and flexible [19]. Thus, our research group recently designed a detection cell for CE determinations with an LED as the light source and a charge-coupled device (CCD) as the detection system [20]. All of the components of the proposed LED-IF-CE detector are commercially available and reasonably priced. The connection of all the components is fairly easy and can be performed by nonexperts. More recently, we demonstrated the system's applicability by analyzing aminated compounds and its analytical performance by comparing it with an LIF-CE method [21].

The aims of the current work are to demonstrate the potential applicability of this novel LED-IF-CE detector for analyzing fluorescence proteins, to develop a similar fluorescence detector that uses a commercial fluorescence spectrometer as the detector, and to compare these two homemade CE instruments. For these purposes, R-phycoerythrin (RPE) and B-phycoerythrin (BPE) were used as models for native fluorescence PBPs to evaluate the performance of the detectors and to demonstrate the applicability of these two schemes in the analysis of biomolecules. The advantages and disadvantages of both systems are discussed in detail.

Materials and methods

Materials and CE system

Fluorescein isothiocyanate isomer I (FITC) was obtained from Scharlau (Barcelona, Spain). A 1-mM stock solution was prepared in acetone (Scharlau). It was stored protected from light at 4 °C for no more than 2 months. FITC solution (10^{-6} M), which was used to adjust the distance between the tip of the probe and the capillary, was freshly prepared by diluting the FITC stock solution with deionized water (Millipore, Bedford, MA, USA).

RPE and BPE were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA) at 10 mg/ml concentration. They were supplied as suspensions in 150 mM sodium phosphate (pH 7.0), 60% ammonium sulfate, 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), and 1 mM sodium azide. They were stored while being protected from light at 4 °C. Stock solutions of these proteins were freshly prepared by diluting the appropriate amount of each protein in doubly distilled water and were stored away from light at 4 °C.

Buffers were prepared by dissolving sodium borate (Sigma) in Milli-Q distilled deionized water and adjusting the pH to the desired value by the addition of 0.5 M HCl and/or NaOH (Sigma). The sodium salt of phytic acid (Sigma) was used as a buffer additive at 10 mM concentration. All buffers were stored in topaz bottles at room temperature for up to 6 months.

All solutions were filtered through a 0.20- μm membrane filter (Millipore) before injection into the capillary. Doubly distilled water was obtained by a Milli-Q water purification system.

A Prince CE system (Prince Technologies, Emmen, Netherlands) was used with 50 μm inner diameter. Uncoated capillaries were purchased from Composite Metal Services (Worcester, UK) with a total length of 57 cm and an effective length of 50 cm to the detector. The system comprises a 0- to 30-kV high-voltage built-in power supply.

LED-IF-CE detection apparatus

Fig. 1 shows the LED-IF-CE system. The optical components are an LS-450 Blue LED (Ocean Optics, Dunedin, FL, USA), a 0.5-inch Industrial Fluorescence Probe (Avantes BV, Eerbeek, Netherlands), a homemade cell, and an AvaSpec-2048 Fiber Optic Spectrometer (Avantes BV).

An LS-450 Blue LED pulsed light source, which produces either pulsed or continuous output at 380, 395, 470, 518, 590, or 640 nm (depending on which LED was placed into the holder), was used as the excitation source. The illumination system was also equipped with an SMA connector to attach to one of the branches of the optical fiber probe. The LED light used was the LED-470, which emits light at a maximum of 470 nm.

A bifurcated optical fiber probe, a 0.5-inch Industrial Fluorescence Probe, was used to focus the light emitted by the LED to the capillary and also to collect the fluorescence emission from the capillary to the CCD camera. A branch of the probe that has 12 UV-Vis fibers of 200 μm external diameter (called the illumination branch) was connected via SMA-905 with the LS-450 Blue LED. The other branch, which is equipped with a 600- μm external diameter fiber and is called the detection branch, was also connected

via SMA-905 with the CCD spectrometer. The end of the probe consists of a stainless-steel cylinder (0.5 inch diameter) containing a 10-mm diameter \times 1-mm thick sapphire window with antireflection coating and the 12 illuminating 200- μm fibers surrounding the single 600- μm fiber that is in the middle of the tip.

A homemade detection cell was developed to align the capillary with the optical fiber probe. This cell consists of a T-style detection cell similar to the cell proposed by Yang and Guan [19]. One 0.5-inch diameter channel was perforated at 90° in a 90 \times 50 \times 32-mm piece of methacrylate and was painted black. Two septums were fixed to maintain the correct position of the capillary in the middle of the 0.5-inch channel. A detection window (\sim 1 cm length) was formed in the capillary by burning off the polyimide coating, and this window was placed in front of the probe, which was placed at 90° to the capillary.

The AvaSpec-2048 Fiber Optic Spectrometer is based on the AvaBench-75 symmetrical Czerny–Turner design with a 2048-pixel CCD detector array. The spectrometer has an SMA fiber-optic entrance connector, a collimating and focusing mirror, and a UV-Vis (200–800 nm) diffractive grating (model code UB) with a blaze at 0 nm and a slit of 500 μm . AvaSoft full software controls the spectrometer and saves the emission spectra. The software also permits the recording of eight different time-drive functions simultaneously, thereby permitting the recording of the emission intensity at eight different wavelengths versus time, at seven wavelengths and a complete emission spectrum versus time, and so on.

Xe lamp-IF-CE detection apparatus

Fig. 2 shows the Xe lamp-IF-CE system. The optical components are a Varian Eclipse commercial luminescence spectrometer (Varian, Palo Alto, CA, USA), a fiber-optic

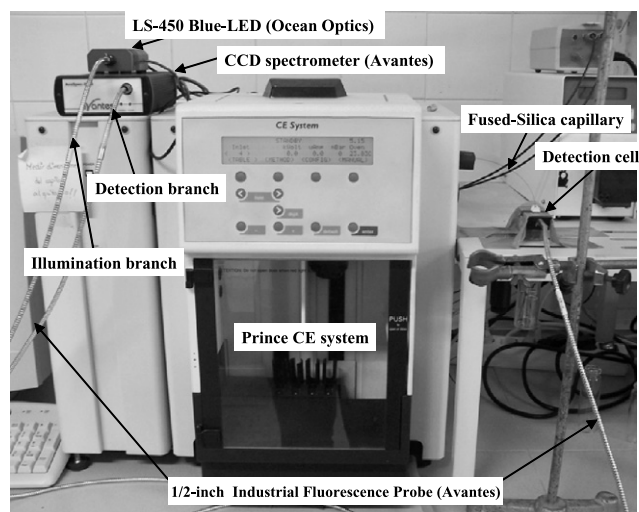


Fig. 1. Picture of the experimental LED-IF-CE detector and its connection with a modular CE instrument.

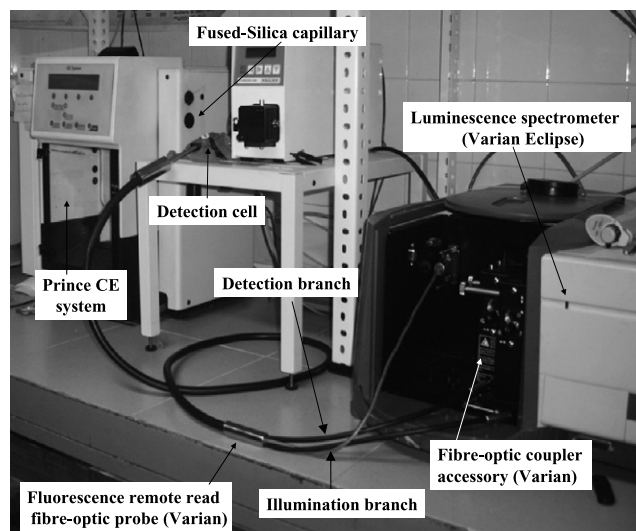


Fig. 2. Picture of the experimental Xe lamp-IF-CE detector and its connection with a modular CE instrument.

coupler accessory (Varian), a fluorescence remote read fiber-optic probe (Varian), and a homemade cell.

A Varian Cary Eclipse Luminescence Spectrometer (Varian Iberica, Madrid, Spain) was used as the excitation source and measure the fluorescence emission as well as to select the excitation and emission wavelengths. It is equipped with a xenon discharge lamp (peak power equivalent to 75 kW), Czerny–Turner monochromators, an R-928 photomultiplier tube (PMT) that is red sensitive (even 900 nm) with manual or automatic voltage controlled using the Cary Eclipse software for Windows 95/98/NT system.

The fiber-optic coupler accessory from Varian enables the use of a fiber-optic probe with the luminescence spectrometer, allowing the user to examine the luminescence properties of samples at locations remote from the instrument via an optical light guide. Thus, it was used to focus both the illumination branch of the fiber probe to the excitation monochromator of the spectrometer and the detection branch to the emission monochromator.

A fluorescence remote read fiber-optic probe (Varian) was used to transport the light from the spectrometer to the capillary and, vice versa, to collect the emission light from the capillary and transport it to the detector of the spectrometer. The illumination branch is based on 100 UV–Vis fibers of 200 μm external diameter, and the detection branch is based on 100 UV–Vis fibers of 200 μm external diameter. The end of the probe consists of a stainless-steel cylinder (8 mm diameter) containing a 10-mm diameter \times 1-mm thick sapphire window with antireflection coating and a random distribution of excitation and collection optical fibers.

The homemade detection cell was the same as that for the LED-CE system except that the optical probe was connected in the opposite channel, which has an 8-mm diameter. A detection window (\sim 1 cm length) was formed in the capillary by burning off the polyimide coating, and this window was placed in front of the probe, which was placed at 90° to the capillary.

Alignment and focusing of optical probes and capillary

An optimum alignment of the probes and capillary was obtained by means of a homemade detection cell in which no focusing optics was necessary [20,21]. One of the most important parameters to take into account in the design of a detection cell is the distance between the tip of the probe and the capillary. By fixing the position of the probe with a screw at 0.13 mm from the capillary, the best signal/noise (S/N) ratio was achieved for a pressure injection of 5 s (35 mbar) of 1 μM FITC in a 50-mM sodium borate buffer (pH 8.3, 20 kV). The scheme of the homemade cell is shown in the [Supplementary material](#).

Electrophoretic method

The capillary conditioning and washing protocols were identical for both fluorescence detectors. Before the first

use, a new capillary was rinsed with 0.2 M NaOH for 15 min and with Milli-Q water for 5 min, followed by a 30-min rinse with the running buffer (50 mM borate and 10 mM phytic acid, pH 8.4). Between consecutive injections, the capillary was conditioned with 0.2 M NaOH for 3 min, with water for 2 min, and with buffer for 5 min. Before the first injection, the conditioning time for buffer was increased to 10 min to obtain reproducible migration times. Fresh buffer was used after six consecutive analyses. All buffers and solutions were filtered through a 0.2- μm syringe filter (Millipore).

Separations were performed in both methods in uncoated fused silica capillaries of 50 μm internal diameter and a total length of 57 cm (50 cm to the detector). Here the CE buffer was formed by 50 mM borate and 10 mM phytic acid (pH 8.4). Hydrodynamic injection was achieved for a period of 20 s at 55 mbar, and 20 kV was applied to power the CE separation. The detection was carried out in different ways, depending on the detector used. For the LED-CCD detector, the excitation was developed by a 450-nm LED and the detection was recorded by integrating the emitted light between 550 and 650 nm with an integration time of 200 ms and an average of 10 scans. For the Xe lamp-PMT (spectrometer) system, the excitation and emission wavelengths were 508 and 580 nm, respectively, the width of both excitation and emission slits were fixed to 20 nm, the optimum detector voltage was 890 V with an average 2 s.

Results and discussion

PBPs, produced by cyanobacteria, are highly fluorescent proteins. PBPs include mainly three classes: phycoerythrin (PE), phycocyanin (PC), and allophycocyanin (APC). PBPs that constitute up to 60% of the soluble proteins in cyanobacterial cells are important analytes to consider due to the importance of cyanobacteria in ocean sciences [7]. Because of their excellent fluorescence quantum yields (0.51–0.98), they have been widely used as fluorescent labels in life sciences.

Optimization of optical parameters

The variables that may affect the fluorescence determination are correlated with the fluorescence detector used. Thus, for the LED-CCD detector, the variables are the LED used to excite the sample (range of λ_{ex}), the wavelength or range of wavelengths that the CCD collected to show the emission intensity (range of λ_{em}), the integration time, and the average. The parameters that may affect the fluorescence determination by using the Xe lamp-PMT detector (commercial fluorescence spectrometer) are λ_{ex} , λ_{em} , detector voltage, excitation and emission slit width, and average. [Table 1](#) summarizes the optimum conditions. All of these experiments were carried out for the electrophoretic separation of 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RPE and 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ BPE. The experimental results are expressed as the averages of

Table 1
Optimum optical and electrophoretic parameters for determining RPE and BPE by LED-IF-CE and Xe lamp-IF-CE

Optical parameters	Optimum values	
	LED-IF-CE	Xe lamp-IF-CE
λ_{ex}	LED-470	508 nm
λ_{em}	Integral 550–650	580 nm
Integration time	200 ms	—
Average	10 scans	2 s
Detector voltage	—	890 V
Slit width (excitation/emission)	—	20/20 nm
Electrophoretic parameters		Optimum values
Concentration of phytic acid		10 mM
pH		8.4
Buffer solution		50 mM borate
Separation voltage		20 kV
Injection time		20 s (55 mbar)

three replicas $\pm st/\sqrt{n}$, where s is the standard deviation, t is the value of the two-sided sample distribution Student's t , and n is the number of replicas ($n = 3$, $t = 4.30$ (confidence level 95%, $2P = 0.05$)).

Fig. 3 shows the excitation and emission spectra of RPE and BPE in 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aqueous solution. RPE shows maximum excitation and emission wavelengths at 565 and 577 nm, respectively, and BPE shows maximum excitation and emission wavelengths at 563 and 577 nm, respectively. The figure also shows the emission spectra of the LED used in this work. The LED emits light in a wavelength range from 425 to 570 nm; thus, it appears that it is well matched to excite both RPE and BPE. Other LED sources were checked, including the LED-395 and LED-515 (Ocean Optics). The LED-395 (emission wavelength range

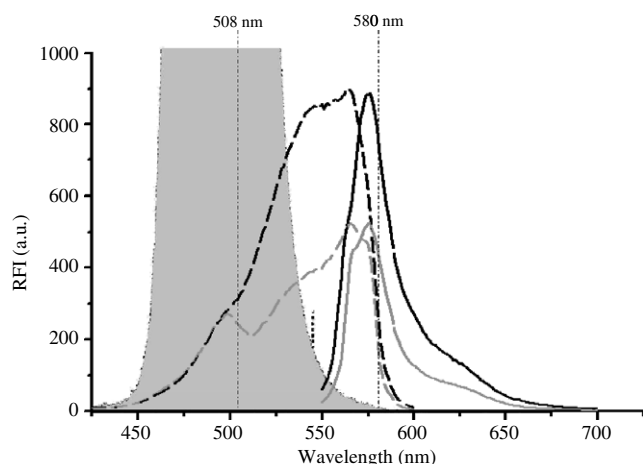


Fig. 3. Excitation (dashed line, ---) and emission (solid line, —) spectra of 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ BPE (black color) and 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RPE (gray color) in water. Scan rate: 1200 nm/min; excitation and emission slit width: 5 nm; detector voltage: 630 V. Spectra were recorded with the Varian Cary Eclipse Luminescence Spectrometer. Also shown are the emission spectra of the LED-470 (dotted line, ···, and gray integral) and the excitation and emission wavelengths (dashed-dotted line, ---) used to obtain the electropherograms in both devices (LED-IF-CE and Xe lamp-IF-CE). RFI, relative fluorescence intensity.

380–420 nm) is less intense and is not well matched to excite both analytes. The LED-518 (emission wavelength range 468–582 nm) is also less intensive than the LED-475; moreover, although it overlaps better with the excitation spectra of RPE and BPE, it has residual light at around 570 nm, preventing the fluorescence detection of the analytes. To eliminate the residual light at 570 nm of the LED-518, several filters were tested, but the intensity of the LED was much lower than without the filter and it was rejected. Thus, the LED-470 was used as the LED source in the LED-CCD detector.

The range of wavelengths used on the CCD for registering the fluorescence emission of the analytes was also optimized. The CCD spectrometer allows the simultaneous registration of at least eight different functions. Several fixed emission wavelengths (570, 580, and 590 nm) and a range of wavelengths that matches the emission spectra of both proteins (between 550 and 650 nm) were tested. The best result for an individual emission wavelength was obtained for 580 nm, but it showed an S/N ratio that was two times lower than the integration between 550 and 650 nm. Thus, an integral between 550 and 650 nm was set as the optimum value to register the fluorescence emission on the CCD detector.

The integration time is the CCD readout frequency and therefore is the exposure time of the CCD detector. The average is the number of scans to average. Both parameters were optimized carefully between 6 and 250 ms and between 0.5 and 15 scans. An increase of the integration time provides an increase of the S/N ratio up to 150 ms. Higher integration times provide the same S/N (20.5 ± 1.2). On the other hand, an increase of the average provides an increase of the S/N up to 5 scans due to the decrease of the background noise, the S/N remains constant (18.9 ± 1.1) between 5 and 10 scans because enough points are recorded to define the electrophoretic peak, and higher averages provide a decrease of the S/N because the increase of the average decreases the number of results used to define the electropherogram. Thus, an integration time of 200 ms and an average of 10 scans, providing electropherograms with one point every 2 s, were selected as optimum values. The Supplementary material shows the variation of the S/N ratio versus both integration time and average.

On the other hand, the optimum excitation and emission wavelengths used on the Xe lamp-PMT detector (commercial luminescence spectrometer) are shown in Fig. 3 as dot-dash lines. The optimum values are 508 nm for excitation and 580 nm for emission. Although the excitation wavelength used was not the maximum excitation wavelength of the analytes, it provides a better S/N ratio than does 560 nm, due principally to the scatter light in the capillary that increases the background signal and therefore increases the noise of the determination.

The detector voltage applied to the PMT affects the sensitivity of the detector. Theoretically, an increase of the detector voltage increases the signal but also increases the

noise. In this case, an increase of the detector voltage up to 850 V provides an increase of the S/N ratio, with higher voltage resulting in a plateau. Detector voltage of 890 V was used for the rest of the experimental work. (The experimental results are shown in the [Supplementary material](#).)

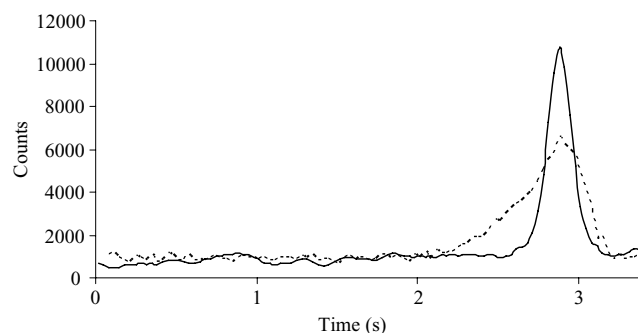
The slit width also affects the sensitivity of the detector, and the average (the number of replicas to average) affects the resolution. Both parameters were optimized (see [Supplementary material](#)), and the best results were obtained for 20 nm excitation and emission slit width and 2 s average.

Optimization of electrophoretic parameters

The variables that may affect the electrophoretic separation are concentration of phytic acid, pH, kind and concentration of buffer solution, voltage, and hydrodynamic injection time. Although these parameters affect only the separation process and not the luminescence determination, they were optimized for both systems (LED-IF-CE and Xe lamp-IF-CE) and the same optimum values were achieved for all of them. [Table 1](#) shows a summary of the optimum experimental conditions.

The use of the dodecasodium salt of inositol-hexaphosphoric acid, better known as phytic acid, has been reported to improve separation efficiency and resolution of proteins [22–25] and peptides [26,27]. Phytic acid has a strong polyanionic character over a wide pH range; therefore, it binds with the positively charged amino acid residues on the proteins and peptides, particularly with lysine and arginine [22,28]. This ion pair formation enhances the efficiency and resolution of protein analysis in CE by reducing the net positive charge of basic proteins, thereby resulting in reduced coulombic interactions with the negatively charged silanol groups on the capillary surface [8]. In addition, they also form complexes, and possible mechanisms include binding of phytic acid to protonated α -NH₂ terminal groups and ϵ -NH₂ groups of lysine residues and a multivalent cation-mediated interaction [29]. To increase the resolution of the CE separation, the concentration of phytic acid was optimized. The best S/N ratio was obtained when 10 mM phytic acid was added to the buffer of separation. [Fig. 4](#) shows the effect of the phytic acid on the separation of RPE (50 μ g/ml). It shows that phytic acid is essential to obtain narrow peaks and therefore to resolve the separation.

The pH is also essential in the electrophoretic separation. The effect of pH on the resolution of the peaks was studied under the following conditions: 50 mM borate and 10 mM phytic acid, 20 kV, and 20 s (55 mbar) of hydrodynamic injection. The range of pH values studied was 6.0 to 9.0, and it was observed that the separations of the analytes improved when the pH increased. pH 8.4 was chosen as optimum pH due to combination of the best resolution, peak shape, and fluorescence intensity. The effect of the pH on the electrophoretic separation is shown in the [Supplementary material](#).



[Fig. 4](#). Electropherograms recorded with the LED-IF-CE device for RPE (50 μ g/ml) in the presence of 10 mM phytic acid (solid line, —) and in the absence of phytic acid (dotted line, ···). Separation conditions: 50 mM borate buffer (pH 8.4), 20 kV, and 20 s (55 mbar) of hydrodynamic injection. The optical conditions were as follows: excitation, LED-470; emission, integration 550 to 650 nm; integration time, 200 ms; average, 10 scans.

When the voltage was increased from 15 to 30 kV, the optimum electropherograms occurred at 20 kV. In addition, higher values of voltage were not attractive because longer capillary conditioning and washing times were necessary to avoid problems associated with the establishment of the currents inside the capillary.

The influence of hydrodynamic injection time was studied in the range from 5 to 30 s, with good sensitivity and resolution being obtained using 20 s (55 mbar).

Typical electropherograms in the LED-IF-CE and Xe lamp-IF-CE devices using the optimized conditions for RPE and BPE are shown in [Fig. 5](#).

Analytical characteristics

The results of the analytical performances of both LED-IF-CE and Xe lamp-IF-CE systems are summarized in [Table 2](#). An evaluation of the sensitivity was made by determining the values of the limit of detection (LOD) calculated in two ways: (i) from the peak area on the basis of $3s_0/b$, where s_0 is the standard deviation of the blank (largest deviation of detector signal from baseline measured in a section of ~ 300 points in the absence of analyte) and b is the slope of every calibration equation, and (ii) from the peak height based on an S/N ratio of 3. Practically the same results were achieved in both ways, so in [Table 2](#) only the LODs calculated from the area are shown.

Although the LOD was worse than that usually achieved by LIF-CE (0.1 μ g/ml) [7], it should be pointed out that the LOD achieved with the homemade LED-IF system (0.5 μ g/ml) is very competitive if one takes into account the lower power of the LED against the laser. In addition, the LED-IF device has enormous advantages that were mentioned in the Introduction. In addition, it allows the recording of the full emission spectra, providing three-dimensional electropherograms that show intensity, emission spectra, and migration time in the same representations, and permits the measurement of intensity of

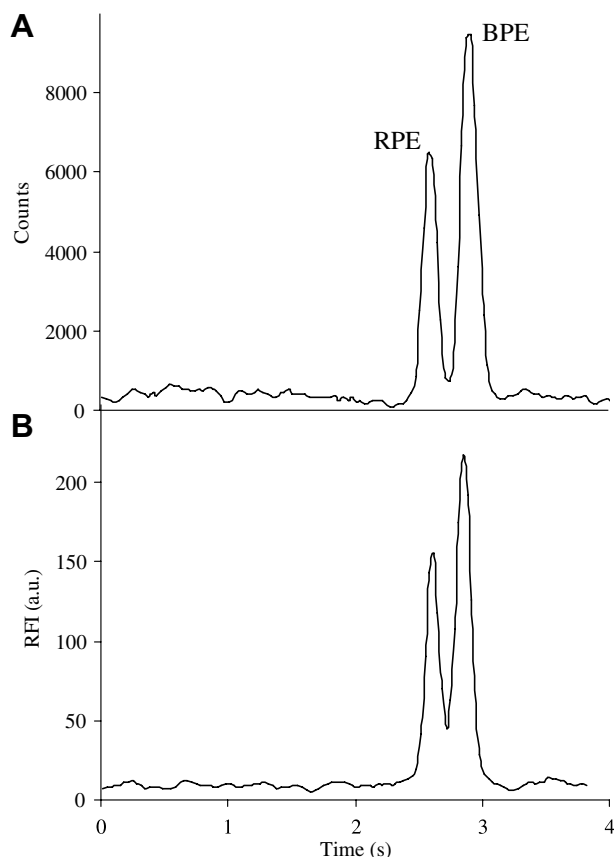


Fig. 5. Optimum electropherograms obtained for RPE (50 $\mu\text{g/ml}$) and BPE (50 $\mu\text{g/ml}$) by using the LED-IF-CE system (excitation: LED-470; emission: integration 550–650 nm; integration time: 200 ms; average: 10 scans) (A) and the Xe lamp-IF-CE system ($\lambda_{\text{ex/em}}$: 508/580 nm; detector voltage: 890 V; excitation and emission slit width: 20 nm; average: 2 s) (B). CE conditions: 50 mM borate buffer and 10 mM phytic acid (pH 8.4), 20 kV, and 20 s (55 mbar) of hydrodynamic injection. RFI, relative fluorescence intensity.

fluorescence both at a fixed wavelength and integration in a range of wavelengths. In addition, it allows the measurement of phosphorescence due to LED being pulsed.

The main cause of low LOD may be the low power of the LED [6,20]. Two different aspects should be modified to improve the LOD. From an instrumental point of view, more powerful LEDs, which can be easily implemented on commercially available fiber-optic couplers, more sensitive CCD detectors, and optical fiber probes that can collect the fluorescence emission more efficiently, should improve the sensitivity of the proposed detector. In addition, the use of capillaries or detection cells that increase the optical path length, such as axial illumination cells and “bubble cell” capillaries, should increase the sensitivity of the proposed device. On the other hand, from an experimental point of view, an increase of the injection times and the use of online preconcentration techniques, such as stacking techniques, should also increase the sensitivity.

The linearity study showed that linear relationships with good correlations in all cases ($r_s > 0.999$) were obtained for the variation of the peak area as a function of the concentration of RPE and BPE using five standards (each solution was injected three times).

Precision is one of the most important criteria for evaluating the analytical method performance, and its numerical value is the relative standard deviation (RSD). The precision of the method was measured as repeatability and reproducibility. The intra- and interday repeatability in the migration times and peak areas were determined as the RSD obtained for six consecutive injections of RPE and BPE at an intermediate concentration value of the calibration curve. It was carried out within the same day and on 3 different days. Table 2 shows that acceptable levels of precision were obtained in terms of repeatability given that in all cases the calculated RSDs were lower than 3.2%. RSDs for migration times always are lower than those for peak areas as well as within-day RSDs, which always are lower than between-day RSDs. The reproducibility of the method was measured as the RSD obtained for three consecutive injections with two capillaries ($n = 6$) from

Table 2
Analytical performance of both methods developed in the LED-CCD and Xe lamp-PMT systems

	LED-IF-CE		Xe lamp-IF-CE	
	RPE	BPE	RPE	BPE
LOD ($\mu\text{g/ml}$)	0.64	0.50	2.73	2.16
Calibration equation ^a	$A = 1070c + 282$	$A = 1315c + 2748$	$A = 0.818c + 0.649$	$A = 1.037c + 2.319$
R	0.9991	0.9993	0.9992	0.9994
Linear dynamic range ($\mu\text{g/ml}$) ^b	0.64–100	0.50–100	2.73–100	2.16–100
Intraday repeatability ^c	RSD _t (%) ^d	0.6	1.6	1.5
	RSD _A (%) ^e	1.5	1.6	3.1
Interday repeatability ^c	RSD _t (%) ^d	1.0	1.6	1.6
	RSD _A (%) ^e	1.6	1.5	3.2
Reproducibility ^f	RSD _t (%) ^d	1.6	1.7	1.1
	RSD _A (%) ^e	1.9	2.1	1.9

^a A represents peak area, and c represents analyte concentration (in $\mu\text{g/ml}$) for five points ($n = 3$).

^b From the detection limits.

^c Measured from six consecutive injections of each analyte within the same day (intraday) and on 3 different days (interday).

^d For migration times.

^e For peak areas.

^f Measured from three consecutive injections ($n = 6$) with two different capillaries.

two different suppliers. Acceptable RSD values were obtained (RSD < 2.2%).

Comparative study

Fig. 5 shows the optimum electropherograms for both methods. The resolution of the LED-IF-CE system is better than that of the Xe lamp-IF-CE device. This could be due to the optical probes used for collecting the emitted fluorescence. The LED system uses only one 600- μm diameter emission fiber, whereas the Xe lamp device uses a large number of fibers; thus, the effective detection window of the LED-IF-CE is lower than that of the Xe lamp-IF-CE. The fact that the temperature cannot be controlled in both systems is a huge disadvantage in achieving better resolution compared with a commercial fluorescence detector for CE; therefore, future works should focus on limiting the detection window area and developing a thermostating device to achieve less band broadening and better LODs and to minimize the differences in migration times compared with LIF-IF-CE systems.

The LED-IF-CE method has the best LODs, obtaining 0.50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for RPE. This could be due to the higher stability of the LED emitted light compared with that of the Xe lamp and could also be due to the possibility of integrating the fluorescence emission between 550 and 650 nm and not using a fixed emission wavelength (580 nm) as the luminescence spectrometer, which can measure the emission at only one wavelength because it uses a PMT as a detector.

With regard to the comparison of the precision, both methods have similar repeatability values in terms of migration times and peak areas. In addition, reproducibility values were also similar when LED-CCD or Xe lamp-PMT was used as the fluorescence detector. In summary, in terms of repeatability and precision, both homemade systems show good percentages.

Another important aspect, cost, can be compared. Taking into account the cost of the components of both devices, the total cost of the LED-IF-CE system is more than five times cheaper than that of the Xe lamp-IF-CE.

High-voltage Xe lamps are not ideal for miniaturizing the system, whereas LEDs are being exploited in the micro-analytical CE system, providing excellent prospects for detector integration and miniaturization. Xe lamps can be used for exciting with UV light, whereas few UV LEDs are available and those that are available are extremely expensive and have very short lifetimes.

With regard to the photodetector, both CCD and PMT detectors are widely used in the development of optical microchips. However, CCD devices are multichannel detectors that allow measurement of more than one emission wavelength simultaneously. They also permit the recording of full emission spectra, providing three-dimensional electropherograms that show intensity, emission spectra, and migration time simultaneously.

Conclusions

Two homemade IF methods have been developed: one with a cheap LED as the light source and a CCD spectrometer as the photodetector and the other with a commercial luminescence spectrometer equipped with a high-voltage Xe lamp as the excitation source and a PMT as the photodetector. Both methods use fiber-optics to transport light and use a homemade cell to focus the probe and the capillary. Thus, both systems use only commercially available, reasonably priced optical components. In addition, both were successfully coupled to CE for the analysis of native fluorescence proteins, that is, PBPs. Both devices can be easily used by nonexperts.

Although the LOD of LED-IF in CE demonstrated here is worse than that usually achieved by LIF-IF, it should be pointed out that the LODs achieved with the homemade LED-IF system are very competitive if one takes into account the lower power of the LED against the laser. In addition, the LED-IF device has enormous advantages such as low cost, ease of use, and high potential for miniaturization. To compensate for the above-mentioned deficiencies, improvements in the design of the detection cell, development of a thermostating system, and the use of LEDs with higher emission efficiency will be considered as future directions. Although the LED-IF system is presented as low cost in comparison with a laser system, the difference in cost is not large enough to outweigh the loss in performance. The homemade LED-IF detector is not expected to displace the LIF-IF detector, but the LED-IF offers another possibility and a cheaper way to solve simple analytical problems for determining biomolecules.

In comparing both methods proposed here, LED-IF offers more advantages than does the Xe lamp-IF detector in terms of sensitivity, resolution, and cost. But the Xe lamp offers the possibility of exciting with UV wavelengths.

In summary, two novel homemade fluorescence detectors that can be used simultaneously with LIF-IF-CE methods for monitoring luminescence biomolecules have been presented. The final choice of the system will depend on the complexity of the sample and on the analytical requirements.

Acknowledgments

This work was supported by project CTQ2005-01914/BQU from the Ministry of Education and Science and project C019 from the Consejería de Agricultura y Pesca of the Andalusian Government. S. Casado-Terrones is grateful for the financial support of her work contract from the Ministry of Education and Science (AP2002-1033), and J. F. Fernández-Sánchez thanks the Andalusian Government for his work contract (RNM-666).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.ab.2007.02.021](https://doi.org/10.1016/j.ab.2007.02.021).

References

- [1] A.L. Lagu, Applications of capillary electrophoresis in biotechnology, *Electrophoresis* 20 (1999) 3145–3155.
- [2] M.A. Jenkins, M.D. Guerin, Capillary electrophoresis procedures for serum protein analysis: Comparison with established techniques, *J. Chromatogr. B* 699 (1997) 257–268.
- [3] W.C. Quigley, N.J. Dovichi, Capillary electrophoresis for the analysis of biopolymers, *Anal. Chem.* 76 (2004) 4645–4658.
- [4] J. Cazes (Ed.), *Analytical Instrumentation Handbook*, 3rd ed., Marcel Dekker, New York, 1997.
- [5] A. Fernandez-Gutierrez, A. Segura-Carretero (Eds.), *Electroforesis Capilar: Aproximación Según la Técnica de Detección*, Editorial Universidad de Granada, Granada, 2005.
- [6] C. Slusny, Y. He, E.S. Yeung, Light-emitting diode-induced fluorescence detection of native proteins in capillary electrophoresis, *Electrophoresis* 26 (2005) 4197–4203.
- [7] P.J. Viskari, C.S. Kinkade, C.L. Colyer, Determination of phycobiliproteins by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection, *Electrophoresis* 22 (2001) 2327–2335.
- [8] P.J. Viskari, C.L. Colyer, Separation and quantification of phycobiliproteins using phytic acid in capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection, *J. Chromatogr. A* 972 (2002) 269–276.
- [9] C. Johns, M. Macka, P.R. Haddad, Design and performance of a light-emitting diode detector compatible with a commercial capillary electrophoresis instrument, *Electrophoresis* 25 (2004) 3145–3152.
- [10] J.S. Kuo, C.L. Kuyper, P.B. Allen, G.S. Fiorini, D.T. Chiu, High-power blue/UV light-emitting diodes as excitation sources for sensitive detection, *Electrophoresis* 25 (2004) 3796–3804.
- [11] J.R. Webster, M.A. Burns, D.T. Burke, C.H. Mastrangelo, Monolithic capillary electrophoresis device with integrated fluorescence detector, *Anal. Chem.* 73 (2001) 1622–1626.
- [12] S. Hillebrand, J.L. Schoffen, M. Mandaji, C. Termignoni, H.P. Grieneisen, T.B. Kist, Performance of an ultraviolet light-emitting diode-induced fluorescence detector in capillary electrophoresis, *Electrophoresis* 23 (2002) 2445–2448.
- [13] A.K. Su, C.H. Lin, Determination of riboflavin in urine by capillary electrophoresis–blue light emitting diode-induced fluorescence detection combined with a stacking technique, *J. Chromatogr. B* 785 (2003) 39–46.
- [14] A.K. Su, Y.S. Chang, C.H. Lin, Analysis of riboflavin in beer by capillary electrophoresis/blue light emitting diode (LED)-induced fluorescence detection combined with a dynamic pH junction technique, *Talanta* 64 (2004) 970–974.
- [15] C.H. Tsai, H.M. Huang, C.H. Lin, Violet light emitting diode-induced fluorescence detection combined with on-line sample concentration techniques for use in capillary electrophoresis, *Electrophoresis* 24 (2003) 3083–3088.
- [16] S. Zhao, B. Wang, H. Yuan, D.J. Xiao, Determination of agmatine in biological samples by capillary electrophoresis with optical fiber light-emitting-diode-induced fluorescence detection, *J. Chromatogr. A* 1123 (2006) 138–141.
- [17] C. Wang, S. Zhao, H. Yuan, D. Xiao, Determination of excitatory amino acids in biological fluids by capillary electrophoresis with optical fiber light-emitting diode induced fluorescence detection, *J. Chromatogr. B* 833 (2006) 129–134.
- [18] S. Zhao, B. Wang, M. He, W. Bai, L. Chen, Determination of free D-alanine in the human plasma by capillary electrophoresis with optical fiber light-emitting diode-induced fluorescence detection, *Anal. Chim. Acta* 569 (2006) 182–187.
- [19] B. Yang, Y. Guan, Light-emitting-diode-induced fluorescence detector for capillary electrophoresis using optical fiber with spherical end, *Talanta* 59 (2003) 509–514.
- [20] D. Arraez-Roman, J.F. Fernandez-Sanchez, S. Cortacero-Ramirez, A. Segura-Carretero, A. Fernandez-Gutierrez, A simple light-emitted diode-induced fluorescence detector using optical fibers and a charged coupled device for direct and indirect capillary electrophoresis methods, *Electrophoresis* 27 (2006) 1776–1783.
- [21] S. Casado-Terrones, S. Cortacero-Ramirez, A. Carrasco-Pancorbo, A. Segura-Carretero, A. Fernández-Gutiérrez, Comparative study between a commercial and a homemade capillary electrophoresis instrument for the simultaneous determination of aminated compounds by induced fluorescence detection, *Anal. Bioanal. Chem.* 386 (2006) 1835–1847.
- [22] G.N. Okafo, H.C. Birrell, M. Greenaway, M. Haran, P. Camilleri, The effect of phytic acid on the resolution of peptides and proteins in capillary electrophoresis, *Anal. Biochem.* 219 (1994) 201–206.
- [23] G.N. Okafo, A. Vinther, T. Kornfelt, P. Camilleri, Effective ion-pairing for the separation of basic-proteins in capillary electrophoresis, *Electrophoresis* 16 (1995) 1917–1921.
- [24] J.R. Veraart, Y. Schouten, C. Gooijer, H. Lingeman, Evaluation of phytic acid as a buffer additive for the separation of proteins in capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A* 768 (1997) 307–313.
- [25] B.P. Salmanowicz, Capillary electrophoresis of seed 2S albumins from *Lupinus* species, *J. Chromatogr. A* 894 (2000) 297–310.
- [26] T. Kornfelt, A. Vinther, G.N. Okafo, P. Camilleri, Improved peptide mapping using phytic acid as ion-pairing buffer additive in capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A* 726 (1996) 223–228.
- [27] K.L. Kostel, A.L. Freed, S.M. Lunte, Complete capillary electrophoretic separation of substance P and its metabolites at neutral pH using ionic run buffer additives, *J. Chromatogr. A* 744 (1996) 241–248.
- [28] O. De Rham, T. Jost, Phytate–protein interactions in soybean extracts and low-phytate soy protein products, *J. Food Sci.* 44 (1979) 596–600.
- [29] M. Cheryan, Phytic acid interactions in food systems, *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 13 (1980) 297–335.

ELECTRONIC SUPPORTING INFORMATION

Simple luminescence detectors using a LED or a Xe lamp, optical fibre and CCD device or photomultiplier for determining proteins in capillary electrophoresis: A critical comparison

Silvia Casado-Terrones, Jorge F. Fernández-Sánchez, Antonio Segura-Carretero*,
Alberto Fernández-Gutiérrez*

*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Granada.
C/Fuentenueva s/n, E-18071 Granada, Spain.*

Index:

- Homemade detection cell used in both LED-IF-CE and Xe lamp-IF-CE systems:
 - Cross-sectional diagram (Fig. S1)
 - Picture (Fig. S2)

- Optimization of instrumental parameters of the CCD spectrometer:
 - Integration time (Fig. S3)
 - Average (Fig. S4)

- Optimization of instrumental parameters of the conventional luminescence spectrometer:
 - Detector voltage (Fig. S5)
 - Slits width (Fig. S6)
 - Average (Fig. S7)

- pH study (Fig. S8)

Homemade detection cell used in both LED-IF-CE and Xe lamp-IF-CE systems

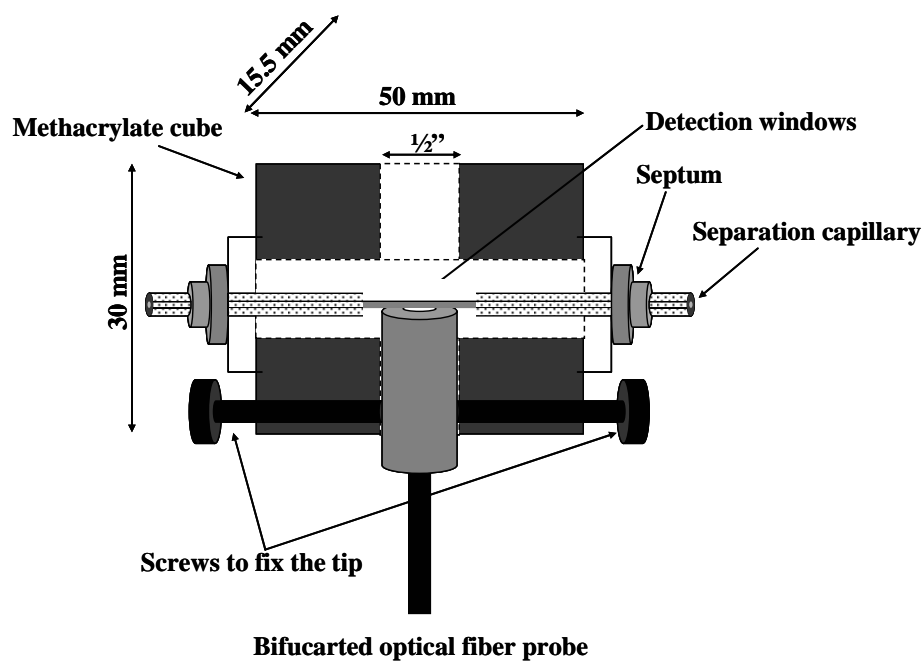


Fig. S1. Cross-sectional diagram of the homemade detection cell used in both LED-IF-CE and Xe lamp-IF-CE systems

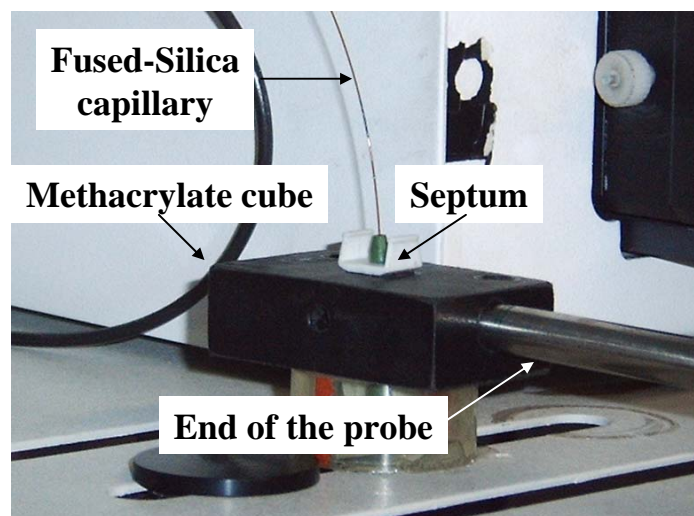


Fig. S2. Picture of the homemade detection cell used in both LED-IF-CE and Xe lamp-IF-CE systems

Optimization of instrumental parameters of the CCD spectrometer

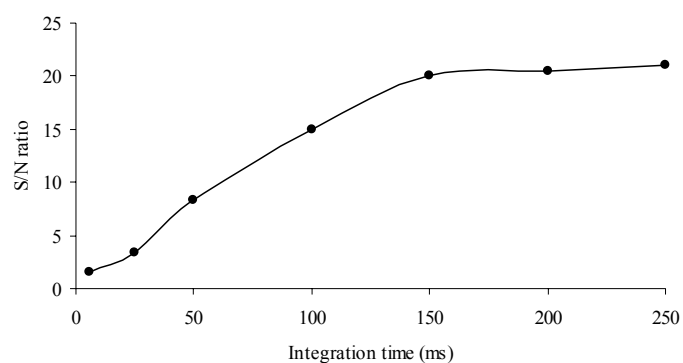


Fig. S3. Effect of the integration time on the S/N ratio separation of RPE (50 $\mu\text{g/mL}$) by using the LED-IF-CE (excitation: LED-470, emission: integration 550-650 nm, average 10 scans). CE conditions: 50mM borate buffer – 10 mM phytic acid (pH 8.4), 20 kV and 20 s (55 mbar) of hydrodynamic injection.

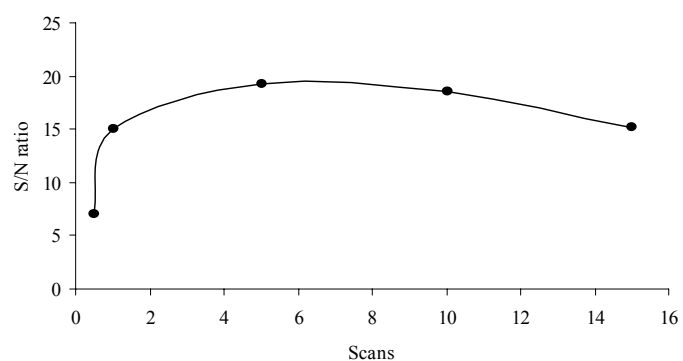


Fig. S4. Effect of the average (scans) on the S/N ratio separation of RPE (50 $\mu\text{g/mL}$) by using the LED-IF-CE (excitation: LED-470, emission: integration 550-650 nm, integration time 200 ms). CE conditions: 50mM borate buffer – 10 mM phytic acid (pH 8.4), 20 kV and 20 s (55 mbar) of hydrodynamic injection.

Optimization of instrumental parameters of the conventional luminescence

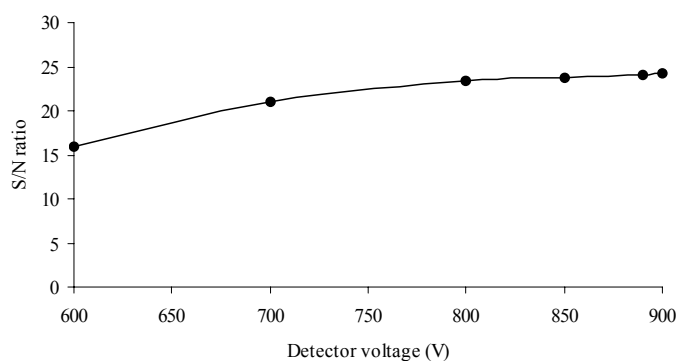


Fig. S5. Effect of the detector voltage on the S/N ratio separation of RPE (50 $\mu\text{g/mL}$) by using the Xe lamp-IF-CE ($\lambda_{\text{exc/em}}=508/580$ nm, excitation and emission slits width: 20 nm, average: 2s). CE conditions: 50mM borate buffer – 10 mM phytic acid (pH 8.4), 20 kV and 20 s (55 mbar) of hydrodynamic injection.

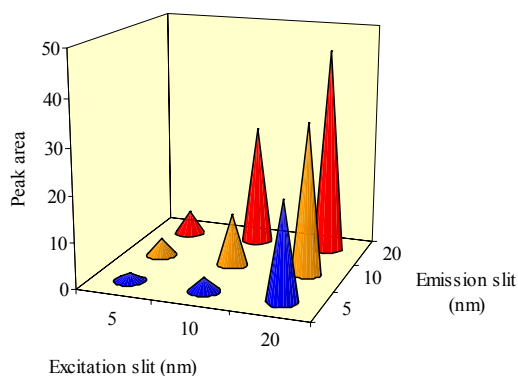


Fig. S6. Effect of the slits width on the S/N ratio separation of RPE (50 $\mu\text{g/mL}$) by using the Xe lamp-IF-CE ($\lambda_{\text{exc/em}}=508/580$ nm, detector voltage: 890 V average: 2s). CE conditions: 50mM borate buffer – 10 mM phytic acid (pH 8.4), 20 kV and 20 s (55 mbar) of hydrodynamic injection.

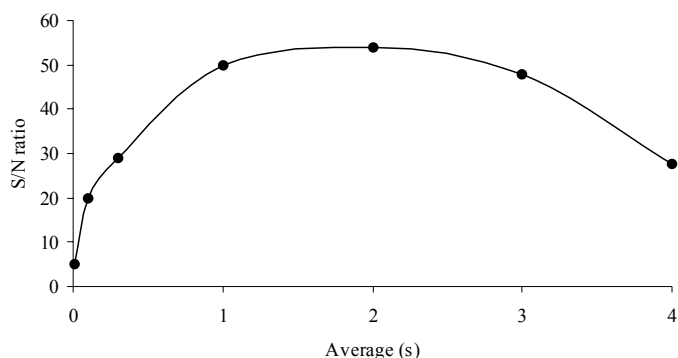


Fig. S7. Effect of the average on the S/N ratio separation of RPE (50 $\mu\text{g/mL}$) by using the Xe lamp-IF-CE ($\lambda_{\text{exc/em}}=508/580$ nm, detector voltage: 890 V, and excitation and emission slits width: 20 nm). CE conditions: 50mM borate buffer – 10 mM phytic acid (pH 8.4), 20 kV and 20 s (55 mbar) of hydrodynamic injection.

pH study

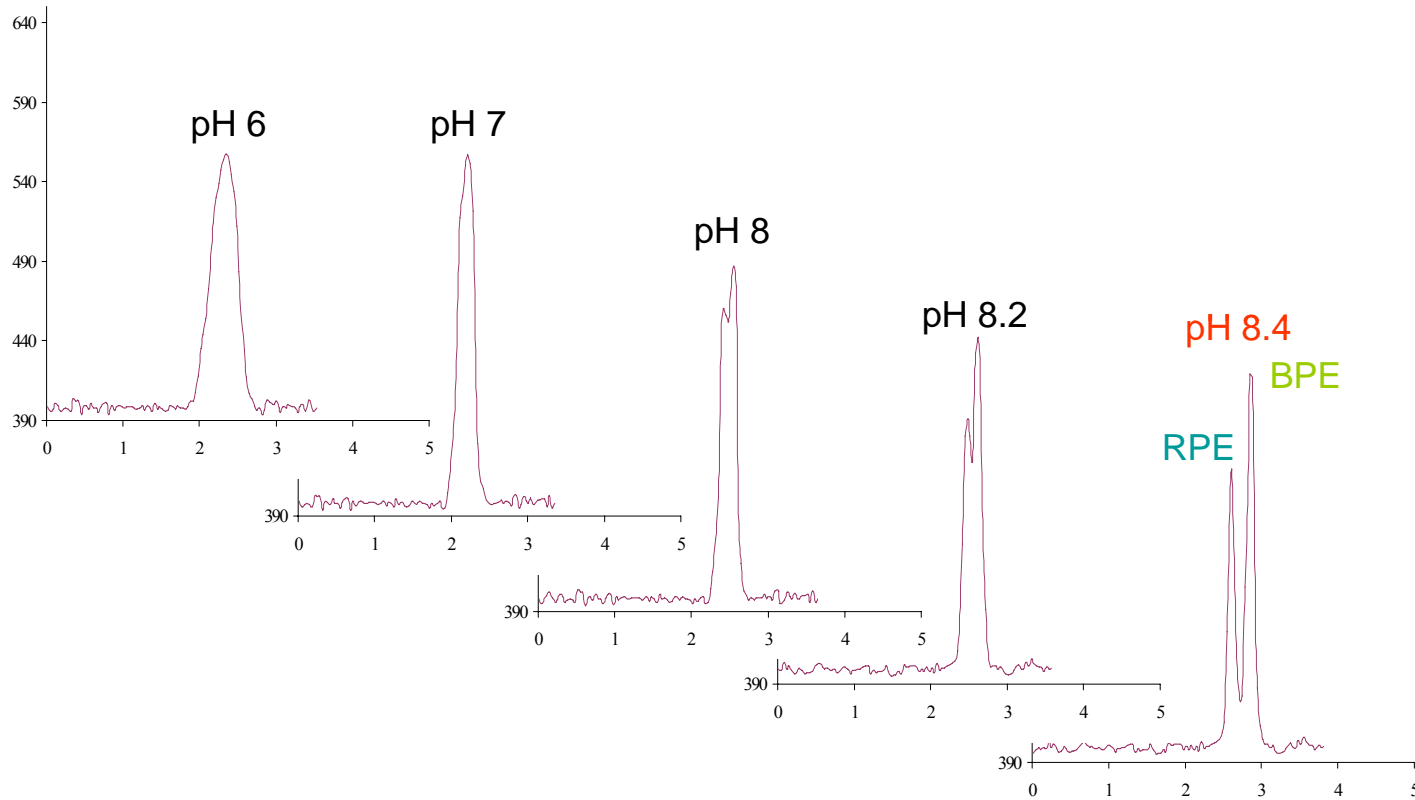


Fig. S8. Effect of the pH on the separation of RPE (50 $\mu\text{g/mL}$) and BPE (50 $\mu\text{g/mL}$) in the Xe lamp-IF-CE ($\lambda_{\text{exc/em}}=508/580$ nm, detector voltage: 890 V, and excitation and emission slits width: 20 nm). CE conditions: 50mM borate buffer – 10 mM phytic acid (pH 8.4), 20 kV and 20 s (55 mbar) of hydrodynamic injection.

Del capítulo número 3 de la presente Memoria Doctoral se han derivado dos publicaciones en las revistas *Analytical & Bioanalytical Chemistry* y *Analytical Biochemistry*. De ellas se pueden destacar los siguientes resultados obtenidos:

1. Se ha desarrollado un novedoso detector fluorescente para CE que hace uso de un LED como fuente de excitación, una sonda de fibra óptica que lleva la radiación desde la fuente al capilar de separación y recoge la radiación emitida hasta el sistema detector (CCD), y una celda de detección diseñada en nuestro laboratorio.

Este sistema detector se ha aplicado a la determinación de aminas y aminoácidos en muestras de cerveza y a la separación de proteínas. De esta forma se han conseguido determinar metilamina y agmatina con LDs de 29 y 78 $\mu\text{g/L}$ respectivamente, en un método electroforético que usa 0.001% de HDB como modificador del EOF, 50 mM de borato a pH 9.3 con 20% 2-propanol; -28 kV y 12 s de inyección.

En lo que respecta a las proteínas, con el detector desarrollado se obtienen LDs de 0.5 y 0.64 $\mu\text{g/mL}$ para la RPE y BPE, respectivamente. El método electroforético consiste en 50 mM de borato a pH 8.4 y 10 mM de ácido fólico; 20 kV y 20 s de inyección.

2. Se han evaluado las prestaciones de este detector fluorescente para CE (LED-IF-CE) comparándolo con un equipo comercial de LIF (LIF-CE), y con un sistema detector que usa un espectrofluorímetro convencional (lámpara de Xn-IF-CE).

2a. En el primer caso, se ha puesto a punto un método electroforético en un equipo comercial de CE que usa un sistema detector LIF (con un láser de ión argón) para determinar trece aminas y aminoácidos en muestras de cerveza, previa derivatización con FITC. Se obtiene un método rápido (en menos de 8 minutos) y sensible, con LDs que van desde 16 $\mu\text{g/L}$ para la metilamina a las 392 $\mu\text{g/L}$ para la 1,6-hexanodiamina. De los trece compuestos aminados derivatizados de partida (glicina, alanina, metilamina, dimetilamina, etilamina, histamina, tiramina, hexilamina,

dibutilamina, putrescina, cadaverina, 1,6-hexanodiamina y agmatina) sólo pueden cuantificarse diez, puesto que dos de ellos solapan (dimetilamina y etilamina) y otro (histamina) migra junto con un pico residual del blanco.

Este método se aplicó con éxito a cinco muestras⁶⁶ recogidas en las fases del proceso de elaboración de una cerveza tipo extra y se indican en la Figura 3-1 y Tabla 3-1.

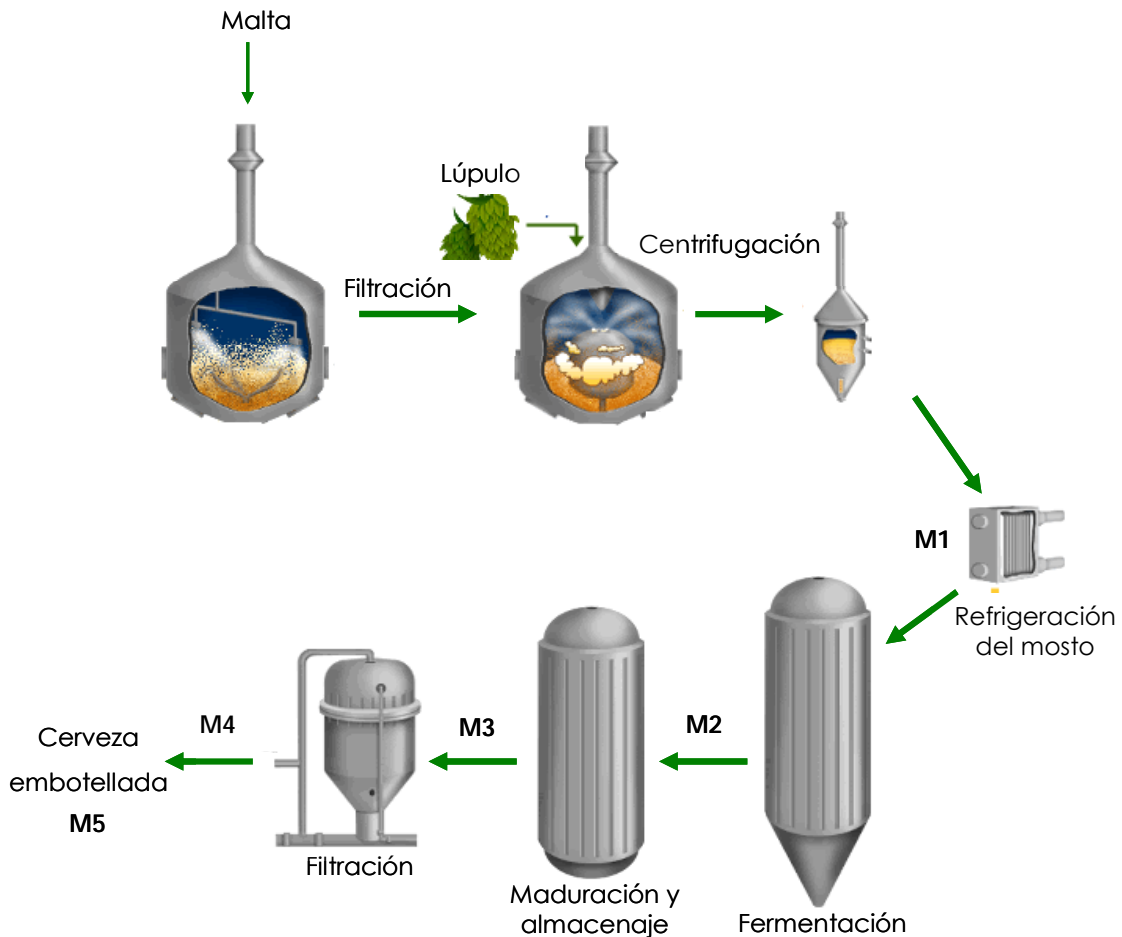


FIGURA 3-1. Esquema del proceso de fabricación de la cerveza mostrando los puntos de recogida de muestra (M).

⁶⁶ Cedidas por Cervezas Alhambra S.L. (Granada).

TABLA 3-1. Muestras recogidas y analizadas en diferentes fases del proceso de fabricación de la cerveza

<i>Muestra</i>	<i>Fase</i>
M1	Mosto frío
M2	Mosto fermentado
M3	Mosto madurado y almacenado
M4	Mosto filtrado
M5	Cerveza extra embotellada

Se pudo identificar en las muestras los trece compuestos aminados (glicina, alanina, metilamina, dimetilamina, etilamina, histamina, tiramina, hexilamina, dibutilamina, putrescina, cadaverina, 1,6-hexanodiamina y agmatina) y cuantificar nueve de ellos (los anteriores menos dimetilamina, etilamina, histamina y 1,6-hexanodiamina) en menos de 8 minutos, con DER en todos los casos menores al 5%.

Al no termostatar el capilar durante la separación y el hecho de que la ventana de detección sea del orden de tres veces mayor en el sistema LED-IF-CE hace que la resolución obtenida sea peor en esta determinación de compuestos aminados.

Aunque los LDs obtenidos con el sistema LIF-CE sean mejores (en torno a 1.8 veces), los conseguidos en el sistema del LED son competitivos, si comparamos la potencia de ambas fuentes de excitación.

En cuanto a la precisión de ambos métodos, se consiguen menores DER con el sistema LIF-CE, pero muy cercanas a las obtenidas en el sistema LED-IF-CE, que en cualquier caso son siempre menores al 5%.

Obviamente, el coste y el potencial de miniaturización del sistema LED-IF-CE son las dos características en las que este sistema compite favorablemente con el del láser.

2b. También se ha llevado a cabo la comparación del sistema LED-IF-CE con un sistema lámpara de Xn-IF-CE. Aquí, el sistema de separación es el

mismo en los dos sistemas: es el mismo equipo de CE y el mismo capilar el que se utiliza en ambos casos. Lo que se modifica es la fuente de excitación (lámpara de Xn en lugar de LED), la sonda de fibra óptica (como accesorio que posee el espectrofluorímetro: la rama que excita y la que recoge la radiación emitida están compuestas cada una por 100 fibras de 200 μm de diámetro externo; al final de la sonda las 200 fibras ópticas están repartidas al azar) y el detector (tubo fotomultiplicador en lugar de la CCD).

Con este detector se obtienen peores resolución y LDs (2.73 y 2.16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para la R-PBE y la B-PBE, respectivamente), debido posiblemente a la forma de recolectar la luz emitida por las proteínas (ya que la ventana de detección es menor en el caso del sistema LED-IF-CE), y también por el hecho de que con la CCD se puede integrar la señal recibida en un intervalo de longitudes de onda, mientras que con el PMT se ha de elegir una sola longitud de onda. En cuanto a coste, el sistema LED-IF-CE sería unas 5 veces más barato que el de lámpara de Xn-IF-CE.

Como conclusión final de este capítulo, en lo que se refiere a comparación de los sistemas de detección usados, se puede afirmar que si bien el sistema LIF-CE gana en sensibilidad y resolución, el sistema LED consigue mejores características en cuanto a precio, miniaturización y facilidad de uso. Obviamente, el sistema LED-IF-CE no pretende desbancar al LIF-CE, si bien es una buena y barata alternativa en problemas analíticos simples, como se ha puesto de manifiesto en la determinación de las proteínas. La elección final de un sistema u otro dependerá, como no, de la complejidad de la muestra a analizar y de los requerimientos analíticos necesarios.

CAPÍTULO 4

Técnicas separativas avanzadas para el análisis de residuos de antibióticos en miel

Las tetraciclinas (TCs) son antibióticos usados ampliamente en la actualidad; en el mundo de la apicultura se utilizan para prevenir y tratar enfermedades infecciosas que puedan afectar a las abejas. Las colmenas (y/o las propias abejas) pueden ser tratadas con estos antibióticos y consecuentemente, la miel recogida de esas colmenas puede estar contaminada con residuos de dichas sustancias. Estos residuos de antibióticos pueden provocar posibles reacciones alérgicas en el ser humano y hacer que los organismos patógenos se hagan resistentes a estas drogas.

En la legislación española no se establecen límites máximos de concentración de TCs en mieles y otros productos de la colmena; se considera ilegal la presencia de cualquier sustancia ajena a estas matrices, independientemente de su procedencia. Es necesario por tanto, disponer y si no, desarrollar métodos sensibles para la determinación de TCs en mieles.

Las TCs han sido ampliamente estudiadas en diversas matrices (preparados farmacéuticos, aguas, pescado, leche, miel, etc) desde el punto de vista cromatográfico y en menor medida desde el punto de vista electroforético (un 73% de las publicaciones relacionadas con el análisis de las TCs usan HPLC frente a un 3% que hacen uso de la CE)⁶⁷. En lo que a la miel respecta, sólo aparece un método electroforético en bibliografía que determina tan sólo cuatro de estos antibióticos en 20 minutos⁶⁸. En cuanto a los métodos cromatográficos, el método más completo determina siete de estos analitos en el rango de las partes por billón⁶⁹. Sin embargo, en ninguna metodología desarrollada hasta ahora se determinaba una TC que puede aparecer en mieles, la rolitetraciclina.

Con la finalidad antes indicada, en este capítulo hemos propuesto métodos rápidos y sensibles para la determinación de ocho TCs

⁶⁷ Samanidou V.F., Nikolaidou K.I., Papadoyannis I.N., *Advances in chromatographic analysis of tetracyclines in foodstuffs of animal origin – a review*, Separation & Purification Reviews 36, 1 (2007).

⁶⁸ Chen T.B., Deng W.H., Lu W.H., Chen R.M., Rao P.F., *Se. Pu.* 19, 91 (2001).

⁶⁹ Oka H., Ikai Y., Kawamura N., Uno K., Yamada M., *Improvement of chemical-analysis of antibiotics. 12. Simultaneous analysis of 7 tetracyclines in honey*, J. Chromatography 400, 253 (1987).

(oxitetraciclina, tetraciclina, clorotetraciclina, doxiciclina, minociclina, metaciclina, demeclociclina y rolitetraciclina) en miel usando dos técnicas separativas diferentes: CE y HPLC acopladas a sistemas de detección UV y de espectrometría de masas. Estos métodos se van a aplicar a siete muestras de mieles españolas de diferente origen floral (multifloral, romero, azahar y eucalipto), demostrando que los métodos desarrollados podrían ser herramientas útiles para el control de calidad de la miel antes de ser puesta en manos de los consumidores.

Estos métodos separativos han dado lugar a las siguientes publicaciones científicas:

⇒ ***Determination of tetracycline residues in honey by CZE with ultraviolet absorbance detection***, publicado en *Electrophoresis* 28, 2882 (2007).

En esta publicación se determinan de forma rápida y sensible ocho TCs por CZE en muestras de miel con detección fotométrica. En el mismo trabajo se desarrolla un método eficiente de extracción en fase sólida con cartuchos C-18 para la extracción de los antibióticos de la miel.

⇒ ***Sensitive reversed-phase high-performance liquid chromatographic separation of eight tetracyclines in honey samples***, enviado a *Journal of Chromatography A* (2007).

En este segundo trabajo se ha desarrollado un método separativo complementario al anterior de CE haciendo uso de HPLC con detección fotométrica para la separación y cuantificación de las ocho TCs en miel, que presenta gran sensibilidad: se mejoran los límites de detección obtenidos por el anterior método electroforético, y se ofrecen los mejores límites de detección presentes en bibliografía.

⇒ ***High performance liquid chromatography - time of flight - mass spectrometry used to determine tetracyclines in honey samples***.

Se ha puesto a punto el acoplamiento de un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo al método HPLC desarrollado en el anterior apartado haciendo uso de la interfase ESI para la determinación de la familia de antibióticos de las TCs en muestras de mieles. De esta forma, la identificación de las TCs se lleva a cabo sin lugar a dudas mediante el análisis de los datos espectrométricos obtenidos tanto en modalidad positiva como en negativa.

Silvia Casado-Torres¹
Antonio Segura-Carretero¹
Simone Busi²
Giovanni Dinelli²
Alberto Fernández-
Gutiérrez¹

¹Department of Analytical
Chemistry, Faculty of Sciences,
University of Granada,
Granada, Spain

²Department of Agricultural
and Environmental
Science & Technology,
University of Bologna,
Bologna, Italy

Received May 22, 2006
Revised January 9, 2007
Accepted January 15, 2007

Research Article

Determination of tetracycline residues in honey by CZE with ultraviolet absorbance detection

We have developed a sensitive CE method to determine eight tetracyclines (TCs) (chlortetracycline, demeclocycline, doxycycline, methacycline, minocycline, oxytetracycline, TC, and rolitetracycline (RTC)) in honey samples. The running buffer was 150 mM sodium borate (pH 9.8) and 2.5% 2-propanol with 15 s hydrodynamic injection at 25 kV. We have also developed an SPE procedure with a C18 cartridge as a clean-up step. Analytes were detected at 360 nm in less than 16 min. LODs ranged in honey from 23.9 µg/kg for TC to 49.3 µg/kg for RTC. Seven samples of Spanish honey of different floral origins were examined. None of them showed contamination with these antibiotics using the proposed method.

Keywords:

Antibiotics / CE / Honey / Tetracyclines

DOI 10.1002/elps.200600614

1 Introduction

Tetracyclines (TCs; see Table 1) are broad-spectrum antibiotics against both Gram-positive and Gram-negative bacteria. To prevent two of the worst enemies of the honeybee, *Streptococcus pluton* in Europe and *Bacillus larvae* in America, which cause foulbrood diseases, beekeepers commonly apply the wide-spectrum antibiotics oxytetracycline (OTC), TC, chlortetracycline (CTC), and doxycycline (DC) to their hives. It is also possible that other TCs may be used for the following reasons: minocycline (MINO) has the highest biological activity among the TCs and is active against TC-resistant pathogens; methacycline (MTC) and demeclocycline (DMCC) are more stable than TC and maintain higher levels of these antibiotics in the hives with smaller doses at less frequent intervals; and finally, rolitetracycline (RTC) is readily soluble in water so that it is more suitable than other TCs for application. Trace residues of these antibiotics may be found in honey. It is a cause of concern to consumers because of possible toxic or allergic reactions and the tendency of pathogenic organisms to become resistant to these drugs [1].

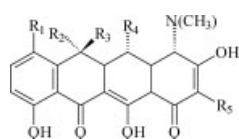
Correspondence: Professor Antonio Segura-Carretero, Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Granada, C/Fuentenueva s/n, E-18071 Granada, Spain
E-mail: ansegura@ugr.es
Fax: +34-958-249510

Abbreviations: CAPSO, 3-(cyclohexylamino)-2-hydroxy-1-propanesulfonic acid; CTC, chlortetracycline; DC, doxycycline; DMCC, demeclocycline; MINO, minocycline; MRL, maximum residue limit; MTC, methacycline; OTC, oxytetracycline; RTC, rolitetracycline; TC, tetracycline

Some countries, such as Japan, apply a zero-tolerance policy to drug levels in honey. There is no common consent among the member states of the European Union regarding the application of the law concerning these antibiotics. In 1990, the Commission of the European Union laid down the procedure for establishing maximum residue limits (MRLs) of veterinary medical products in foodstuffs of animal origin [2]. Nevertheless, no MRLs have been fixed for use with bee products, although some countries, such as the United Kingdom and Switzerland, have set MRLs for TCs in honey to 50 µg/kg. Switzerland has also forbidden the treatment of infected hives against these diseases and instead advocates burning the complete hive [3]. There is no law in Spain concerning the control of these drugs in honey, although the law controlling the quality of honey (<http://www.boe.es/boe/dias/2003-08-05/pdfs/A30181-30183.pdf>) (R.D. 1049/2003) states that any type of additive whatsoever is illegal.

Many analytic methods to detect TC residues in foods have been described [4], the majority of them involving HPLC. TCs in honey have been widely studied with this technique [5–12] despite the difficulties associated with peak tailing and low efficiency due to interaction with silanols and trace metals present in silica-based packaging material. This is a widely and often cited complaint made against HPLC when detecting TCs.

The physicochemical properties of TCs, particularly their ionic nature, multiple ionization sites, and water solubility, make them suitable for electrophoretic analysis. CE has gained importance as a powerful analytical tool due to features such as high efficiency, high resolution, full automation, compatibility with a variety of detection schemes, and low consumption of sample and solvent volume in comparison

Table 1. Structures of TC antibiotics studied

Compound	Symbol	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Chlortetracycline	CTC	Cl	CH ₃	OH	H	CONH ₂
Demeclocycline	DMCC	Cl	H	OH	H	CONH ₂
Doxycycline	DC	H	CH ₃	H	OH	CONH ₂
Methacycline	MTC	H	=CH ₂		OH	CONH ₂
Minocycline	MINO	N(CH ₃) ₂	H	H	H	CONH ₂
Oxytetracycline	OTC	H	CH ₃	OH	OH	CONH ₂
Tetracycline	TC	H	CH ₃	OH	H	CONH ₂
Rolitetracycline	RTC	H	CH ₃	OH	H	CONH—CH ₂ —N ₅

with HPLC [13, 14]. CE methods for detecting several TCs can be found in the literature: in pharmaceutical preparations [15–20], in water samples [21, 22] and in foodstuffs (milk [23, 24], fish [25], and honey [26]). In the only previous study of TC (to the best of our knowledge) in honey using CE, Chen *et al.* got the separation of four TCs in 20 min with a buffer 0.02 M Na₂HPO₄–0.01 M citric acid (pH 3.2) with 4% *N*-methylmorpholine and 12% ACN, reporting detection limits of 10–40 µg/L.

We describe here the development of a faster and sensitive analytical method using CZE that is capable of separating and detecting eight TCs in honeys of different floral origins.

2 Materials and methods

2.1 Apparatus

We used two P/ACE™ System MDQ CE instruments from Beckman (Palo Alto, CA, USA) equipped with a DAD, and GOLD software loaded on a personal computer. Separations were performed in fused-silica capillaries of 50 µm id and 375 µm od bought from Composite Metal Services (Worcester, England) and from Beckman. The capillaries had a total length of 47 cm and 40 cm to the detector. Capillary temperature was adjusted using a fluorocarbon-based cooling fluid. A model MicropH 2002 meter from Crison (Barcelona, Spain) was used to adjust the pH of the buffers at a precision of 0.01 pH unit. A Heidolph VV microrotary evaporator (Schwabach, Germany) coupled to a Büchi B-169 vacuum system (Flawill, Switzerland) was used to concentrate the sample extracts. For SPE, a Supelco Preppy vacuum manifold (Bellefonte, PA, USA) and C-18 extraction cartridges from Discovery (Sigma, St. Louis, MO, USA) were used. Finally, we used a G560E Vortex-Genie 2 (Scientific Industries, Bohemia, NY, USA) as a vortex mixer.

2.2 Reagents and samples

All reagents were of analytical grade. Sodium borate, 3-(cyclohexylamino)-2-hydroxy-1-propanesulfonic acid

(CAPSO), glycine (aminoacetic acid), and dioxane were from Sigma. Anhydrous sodium carbonate, 2-propanol, methanol, ACN, EDTA disodium salt hydrate, and ethyl acetate were from Panreac (Barcelona, Spain). Sodium hydroxide, boric acid, hydrochloric acid, and THF were from Merck (Darmstadt, Germany).

The eight TC antibiotics employed were from Sigma. They must be handled with care as they cause irritation to the skin. Individual standard stock solutions were prepared in methanol/water (70:30 v/v), due to their being more soluble in this mixture than in water, at a concentration of 1000 mg/L, and were stored at –4°C in amber glass (to prevent photodegradation) for a maximum of two months. Working standard solutions were prepared daily by diluting this concentrated stock solution. Milli-Q water of 18.2 MΩ·cm resistivity was used throughout (Millipore, Billerica, MA, USA).

A total of seven honey samples were bought from different local markets in Granada (Spain) in March 2005. Three of them were multiflower honeys, two were from rosemary flowers, one from orange blossom, and the other from eucalyptus. All the samples were stored in a dark, dry cupboard at room temperature.

2.3 Electrophoretic procedure

Before first use, a new capillary was rinsed with 0.2 M NaOH for 15 min and Milli-Q water for 5 min, followed by a 30-min rinse with the running buffer: 150 mM sodium borate (pH 9.8) and 2.5% 2-propanol. This buffer resulted in a current of ~250 µA. Solutions were injected into the capillary on the anodic side under a low pressure of 0.5 psi (1 psi = 6895 Pa) for 15 s. The capillary was kept at 25°C and a voltage of 25 kV was applied to separate the analytes. Photometric measurements were made at 360 nm. The optimum electropherogram of a mixture of eight TCs obtained under these conditions is shown in Fig. 1. The different peaks were identified by migration times, coinjection of standards, and diode array spectra.

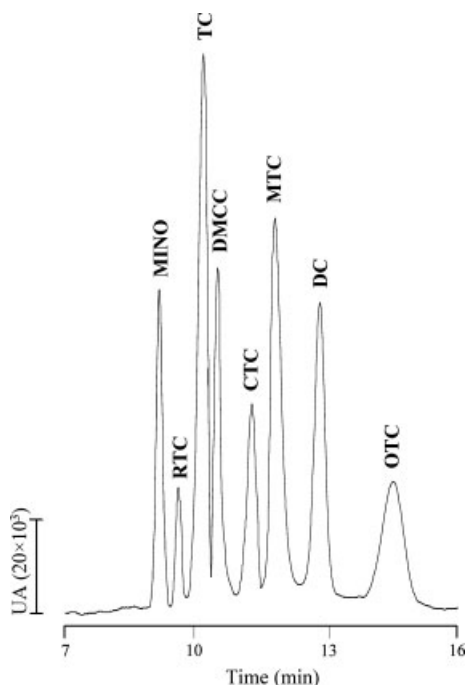


Figure 1. CZE of a mixture of eight TCs at 100 mg/L. Buffer, 150 mM sodium borate (pH 9.8) with 2.5% 2-propanol; injection by pressure, 0.5 psi for 15 s; capillary, 47 cm (40 cm to the detector) \times 50 μ m id; temperature, 25°C; applied voltage, 25 kV; current intensity, \sim 250 μ A; UV detection at 360 nm.

2.4 Procedure for honey samples

A sample of honey (20 g) was dissolved in 30 mL of 0.1 M Na₂EDTA, pH 4.0. The solution was stirred for 5 min at 500 rpm using a vibratory stirrer. After filtration, it was loaded onto a Discovery C-18 (1 g) cartridge previously conditioned with 10 mL of methanol, 10 mL of water, and 10 mL of 0.1 M Na₂EDTA solution. The SPE cartridge was then washed with 10 mL of water and after 5 min drying in air by aspiration, the TCs were eluted with 10 mL of ethyl acetate directly into a 25 mL volumetric flask. The eluate was evaporated to dryness under reduced pressure at 40°C. The residue was dissolved in 1 mL of separation buffer, stirred in a vortex and filtered before being injected into the CE system.

3 Results and discussion

3.1 Optimization of CZE separation

The pK_a values relevant to acid–base equilibrium in an aqueous solution of the antibiotics are agreed to be approximately 3.3, 7.5, 9, and 11 [27]. This indicates that TCs contain localized charges across all pH values and only achieve an overall neutral state as zwitterions between pH 3.3 and 7.5. Below these values it is easy for them to form 4-epi-TCs and

anhydro-TCs. Thus, we assayed pHs greater than 7.5, at which TCs are negatively charged and their electrophoretic mobility is opposite to electro-osmosis.

While keeping the other conditions constant, the pH of a 125 mM sodium borate buffer solution was varied from 8.5 to 10.5 with 1 M boric acid or 1 M NaOH.

The analytes separated more efficiently as the pH rose to 9.8 but above this value there was no improvement in the resolution and analysis times were lengthier. Therefore, we chose a pH of 9.8 for our further experiments.

To improve the resolution, we investigated the influence of the nature of the buffer on the separation. Three different buffers CAPSO, glycine, and carbonate were assayed as well as sodium borate 125 mM. Solutions of 250 mM CAPSO, 300 mM glycine, and 100 mM sodium carbonate buffers were prepared by dissolving the appropriate amount of the salt in water and adjusting the pH to 9.8. Our results showed that sodium borate gave the best separation plus a satisfactory analysis time. Using glycine and sodium carbonate, the migration time was very short and they could hardly separate any substances from the mixture. CAPSO gave the worst electropherogram, with no resolution at all. Thus, we made all subsequent experiments with sodium borate at pH 9.8.

The concentration of the buffer has a major influence on EOF and the current produced in the capillary. This influence was investigated by varying the buffer concentration from 75 to 150 mM. Higher concentrations of sodium borate could not be assayed because they resulted in more than 300 μ A, the maximum current permitted in the CE equipment.

The migration times of the TCs increased concomitantly with an increase in buffer concentration, the best separation occurring at 150 mM, where there was only an overlap between RTC and TC (Fig. 2). On the basis of the literature [20], this overlap could be resolved by adding substances such as organic solvent to the buffer.

Different organic solvents such as ACN, methanol, and 2-propanol were assayed, the best results being obtained with 2-propanol. Optimum resolution was attained with 2.5% 2-propanol, when the overlap between RTC and TC disappeared. Separation times were also lengthened because the increase in zeta potential (towards large negative numbers) promotes a decrease in the EOF and increase in migration times. The voltage chosen was 25 kV. Higher values entailed a loss of resolution and lower ones involved longer migration times.

We also studied sample injection times within the range of 5–20 s. A considerable increase in sensitivity was observed, but the resolution between the TCs decreased. Good sensitivity and resolution were obtained using an injection time of 15 s.

Between consecutive injections the capillary was conditioned with 0.2 M NaOH for 3 min, water for 2 min, and buffer for 5 min. This conditioning method was used to obtain reproducible migration times. Fresh buffer was used after six consecutive analyses. All buffers and solutions were filtered through a 0.2 μ m syringe filter (Millipore).

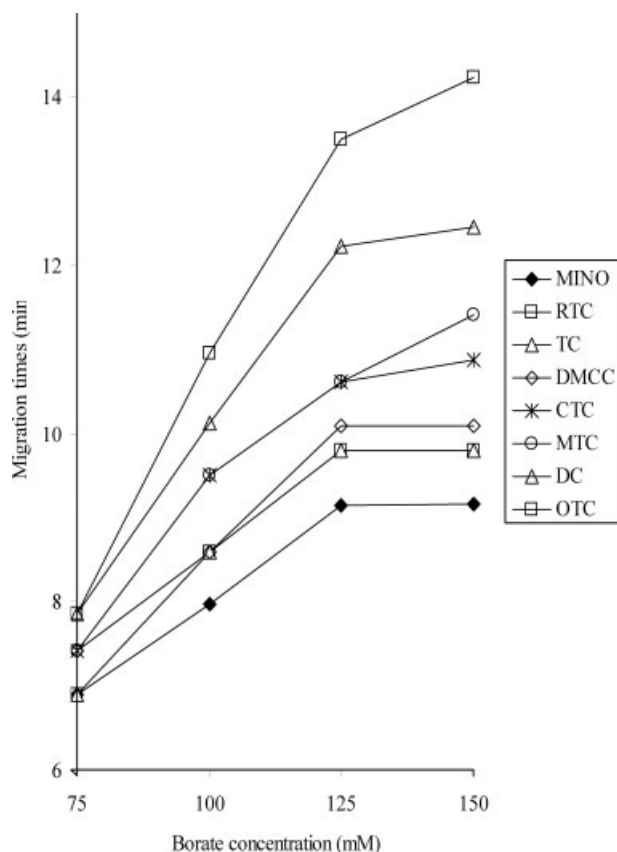


Figure 2. Effect of sodium borate concentration on the migration times of the TCs. Buffer, sodium borate (pH 9.8); other instrumental conditions as in Fig. 1.

3.2 Linearity, LODs, and precision of the method

Under the optimum conditions described above, working curves of the eight TCs were obtained within the concentration range of 10–100 mg/L. Each point of the calibration graph corresponded to the mean value from three independent injections. The parameters of the regression equations, detection limits, and precisions were obtained with TC standards (Table 2). Linearity was good, as shown by the fact that the correlation coefficients (r) were above 0.999 for all the calibration equations.

LODs were calculated from the peak area on the basis of $3\sigma/b$, where σ is the SD of the blank (the largest deviation of the detector signal from the baseline measured in a section of about 300 points in the absence of analyte) and b the intercept of every calibration equation.

The precision of the method described was measured in terms of repeatability and reproducibility. The intra- and interday repeatabilities in the migration times and peak areas were determined as the RSD obtained for six consecutive injections of each TC at three different concentrations of the calibration curve, carried out within the same day and on three different days. Table 2 shows that acceptable levels of precision were obtained in terms of repeatability since in all cases the RSDs calculated were lower than 10%.

The reproducibility of the method was measured in terms of RSD obtained for three consecutive injections with two CE equipments, using capillaries from different suppliers in each equipment and with two different technicians ($n = 12$). Acceptable RSD values of <9.9% were obtained for migration times.

Table 2. Performances of the proposed CZE method for the determination of TCs in honey samples

TCs	Detection limit		Regression equation ^{a)}	Calibration range ^{b)} (mg/L)	Repeatability ^{c)} intraday						Repeatability ^{d)} interday		Reproducibility ^{h)} RSD _t (%)
	mg/L	μg/kg			RSD _t ^{d)} (%)			RSD _A ^{f)} (%)			RSD _t (%)	RSD _A (%)	
					5 ^{e)}	50 ^{e)}	100 ^{e)}	5 ^{e)}	50 ^{e)}	100 ^{e)}			
MINO	0.55	35.0	$A = 1924.2c + 1528.6$	1.84–100	8.27	8.01	5.04	9.52	8.63	8.20	7.24	9.97	8.01
RTC	0.65	49.3	$A = 1387.7c + 3068.8$	2.17–100	5.52	6.20	5.23	9.80	8.54	8.29	6.94	9.67	7.74
TC	0.34	23.9	$A = 3105.9c - 10815.4$	1.14–100	3.14	2.15	6.89	9.36	9.02	8.63	7.02	9.95	6.85
DMCC	0.49	33.9	$A = 2153.4c - 2502.8$	1.65–100	7.06	7.23	6.54	9.59	8.63	8.42	8.72	9.78	8.52
CTC	0.67	41.7	$A = 1585.2c - 508.2$	2.24–100	5.38	5.84	6.32	9.42	5.72	8.69	7.36	9.15	9.85
MTC	0.41	28.8	$A = 2563.3c + 10012.6$	1.38–100	8.72	6.24	3.75	9.55	8.99	7.58	6.99	9.04	9.90
DC	0.42	26.9	$A = 2541.7c - 2007.9$	1.39–100	7.58	3.17	3.00	9.94	8.69	5.91	5.35	8.99	8.34
OTC	0.47	39.7	$A = 2248.5c - 1200.7$	1.58–100	7.49	5.60	3.54	9.82	8.85	8.05	6.09	8.81	9.75

a) A represents peak area (time \times absorbance units); c means analyte concentration (mg/L) for five points ($n = 3$).

b) From the quantification limit.

c) Measured from six consecutive injection of each analyte within the same day.

d) For migration times corresponding to each TC.

e) mg/L.

f) For peak areas corresponding to each TC.

g) Measured from six consecutive injection of each analyte (50 mg/L) on three different days.

h) Measured from three consecutive injections with two different CE equipments and two different technicians ($n = 12$) for each analyte at 50 mg/L.

3.3 Extraction and clean-up optimization

To determine TCs in honey, a previous extraction step had to be optimized. Literature searches and published reviews reveal that extractions are normally water-based, the EDTA pH 4 system being the most commonly used [4, 8, 28–31]. TCs could theoretically be applied to a wide range of SPEs. The nonpolar regions of the ring system allow for clean-up using RP C18 sorbent. The optimization of the clean-up procedure was as follows: a 20 g sample of honey was contaminated with TCs at concentrations of 1.5 mg/kg, and then treated as explained in Section 2. The variables optimized for the SPE extraction were: the way the cartridge was conditioned, the influence of a washing step, the optimum solvents, and the volume for eluting TCs from the cartridge.

The C18 cartridges were previously activated with 10 mL of methanol and 10 mL of water and conditioned with 10 mL of 0.1 M Na₂EDTA solution to prevent any interaction of TCs with the silanols and trace metals present in the silica packaging material. This is a widely cited drawback in TC analysis, as they can interact with SPE cartridges by different mechanisms, including hydrophobic interactions, hydrogen bonding, chelation, and cation exchange.

We found that TCs were well retained in the cartridge and not eluted during the washing step, so we went on to study the solvents and the optimum volume for their elution. To this end we assayed several solvents, such as methanol, dioxane, THF, and ethyl acetate (see Fig. 3). Ethyl acetate and methanol both led to satisfactory results, the best recovery rate being found with ethyl acetate. Thus, we assayed 1, 2.5, 5, 10, and 15 mL of ethyl acetate. Our results showed that 1, 2.5, and 5 mL were not sufficient to elute all TCs, with 10 mL all TCs were eluted, and no improvement was observed in a further elution with 15 mL. Therefore, we chose 10 mL as the optimum volume.

3.4 Application of the CZE method for the detection of TCs in honey: Recovery studies

Seven representative Spanish honey samples of different floral origins (three multiflower honey, two of rosemary, one of orange blossom, and one of eucalyptus) were previously analyzed by HPLC in a laboratory specializing in honey analysis (Apinevada Laboratory, Lanjarón, Granada, Spain; www.apinevada.com) to find out whether they were contaminated by TCs. All the tests gave negative results; if the samples contained TCs, these levels were under the LODs.

Thus, we checked the applicability of our method on these blank honey samples. A recovery study was carried out by contaminating the seven honey samples (20 g) with three concentrations of TCs (Table 3). There were no significant differences in the recoveries between the different floral origins. Percentages of between 55 and 89% were attained. The

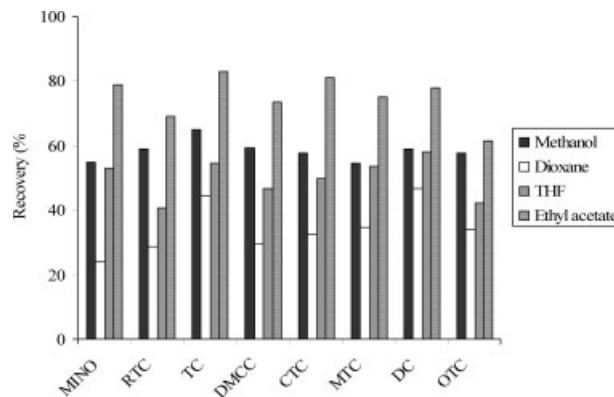


Figure 3. Comparison of the recoveries for TCs from a contaminated honey sample by using 10 mL of different solvents.

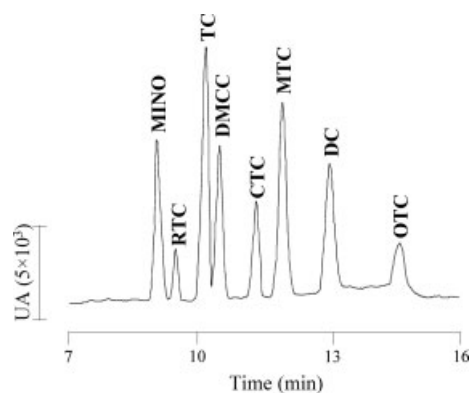


Figure 4. Electrophoretic profile of TCs in a contaminated rosemary honey at 150 µg/kg, after SPE using the conditions described in the text.

RSD of the measurements ranged from 8.30 to 9.85% ($n = 3$). A typical electropherogram of TCs extracted from the contaminated samples is shown in Fig. 4.

4 Concluding remarks

The herein described method is a rapid and sensitive CE method for the determination of residues of eight TCs in honey samples. The eight TCs investigated were separated in less than 16 min. LOD values achieved varied from 23.9 µg/kg for TC to 49.3 µg/kg for RTC, these values being within existing MRL guidelines in some European countries.

SPE proved to be an adequate tool for sample clean-up. Good sensitivity, resolution, and a relatively short analysis time combined with the simplicity of the procedure should make this method a useful tool for the quality control of honey before being sold to the consumer.

A total of seven samples of Spanish honeys of different botanical origin were examined. None of them showed contamination of the TC residues at detectable levels.

Table 3. Recoveries for the determination of the eight TCs in honey samples

	Added ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Recovery %							
		MINO	RTC	TC	DMCC	CTC	MTC	DC	OTC
Sample 1 – multiflower honey	150	73	64	62	64	75	68	75	55
	1000	84	65	68	72	79	71	77	58
	5000	86	79	80	72	84	77	84	66
Sample 2 – rosemary honey	150	63	61	64	70	73	69	70	56
	1000	85	66	69	75	86	72	73	60
	5000	84	66	84	77	85	79	89	65
Sample 3 – orange honey	150	75	75	69	68	80	69	72	62
	1000	77	85	73	77	82	72	84	64
	5000	77	79	65	84	85	79	80	64
Sample 4 – eucalyptus honey	150	74	70	65	62	79	59	72	58
	1000	88	80	75	84	75	60	71	65
	5000	82	80	78	87	80	62	80	65

5 References

- [1] Van den Bogaard, A. E., Stoobberingh, E. E., *Int. J. Antimicrob. Agents* 2000, 14, 327–335.
- [2] Council Regulation (EEC) No. 2377/90, *Off. J. Eur. Commun.* 1990, L224/1.
- [3] Sporns, P., Kawn, S., Roth, L. *J. Food Prot.* 1986, 49, 383–388.
- [4] Oka, H., Ito, Y., Matsumoto, H., *J. Chromatogr. A* 2000, 882, 109–133.
- [5] Martel, A. C., Zeggane, S., Drajnudel, P., Faucon, J. P., Aubert, M., *Food Addit. Contam.* 2006, 23, 265–273.
- [6] Samanidou, V. F., Nikolaidou, K. I., Papadoyannis, I. N., *J. Sep. Sci.* 2005, 28, 2247–2258.
- [7] Khong, S. P., Hammel, Y. A., Guy, P. A., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2005, 19, 493–502.
- [8] Viñas, P., Balsalobre, N., López-Erro, C., Hernández-Córdoba, M., *J. Chromatogr. A* 2004, 1022, 125–129.
- [9] Wang, L., Xu, Z. X., Zhang, Z. S., Shao, X. G., *Chin. J. Anal. Chem.* 2003, 31, 52–54.
- [10] Pagliuca, G., Gazzotti, T., Serra, G., Sabatini, A. G., *Apidologie* 2002, 33, 583–584.
- [11] Nakazawa, H., Ino, S., Kato, K., Watanabe, T. *et al.*, *J. Chromatogr. B* 1999, 732, 55–64.
- [12] Oka, H., Ikai, Y., Hayakawa, J., Harada, K. *et al.*, *J. Agric. Food Chem.* 1994, 42, 2215–2219.
- [13] Landers, J. P. (Ed.), *Handbook of Capillary Electrophoresis*, CRC Press, Washington 1997.
- [14] Shintani, H., Polonsky, J. (Ed.), *Handbook of Capillary Electrophoresis Applications*, Blackie, London 1997.
- [15] Tavares, M. F. M., McGuffin, V. L., *J. Chromatogr. A* 1994, 686, 129–142.
- [16] Li, Y. M., Van Schepdael, S. H., Roets, E., Hoogmartens, J., *J. Chromatogr. A* 1996, 740, 119–123.
- [17] Li, Y. M., Van Schepdael, S. H., Hoogmartens, J., *J. Liq. Chromatogr.* 1997, 20, 273–282.
- [18] García-Ruiz, C., Crego, A. L., Lavandera, J. L., Marina, M. L., *Electrophoresis* 2001, 22, 2775–2781.
- [19] Vargas Mamani, M. C., Amaya Fafrán, J., Reyes Reyes, F. G., Rath, S., *Talanta* 2006, 70, 236–243.
- [20] Tjørnelund, J., Hansen, S. H., *J. Chromatogr. A* 1996, 737, 291–300.
- [21] Nozal, L., Arce, L., Simonet, B. M., Ríos, A., Valcárcel, M., *Anal. Chim. Acta* 2004, 517, 89–94.
- [22] Nozal, L., Simonet, B. M., Arce, L., Ríos, A., Valcárcel, M., *Anal. Chim. Acta* 2006, 560, 69–76.
- [23] Chen, C. L., Gu, X., *J. AOAC Int.* 1995, 78, 1369–1377.
- [24] Tjørnelund, J., Hansen, S. H., *J. Chromatogr. A* 1997, 779, 235–243.
- [25] Huang, T. S., Du, W. X., Marshall, M. R., Wei, C. I., *J. Agric. Food Chem.* 1997, 45, 2602–2605.
- [26] Chen, T. B., Deng, W. H., Lu, W. H., Chen, R. M., Rao, P. F., *Se. Pu.* 2001, 19, 91–93.
- [27] Mitscher, L. A. (Ed.), *The Chemistry of the Tetracycline Antibiotics*, Marcel Dekker, New York 1978.
- [28] Anderson, C. R., Rupp, H. S., Wu, W. H., *J. Chromatogr. A* 2005, 1075, 23–32.
- [29] Pena, A., Pelantova, N., Lino, C. M., Silveira, M. I. N., Solich, P., *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 3784–3788.
- [30] Pena, A., Lino, C. M., Silveira, M. I. N., *J. AOAC Int.* 2003, 86, 925–929.
- [31] Cinquina, A. L., Longo, F., Anastasi, G., Giannetti, L., Cozzani, R., *J. Chromatogr. A* 2003, 987, 227–233.

Como se ha hecho mención antes, los resultados obtenidos tras el trabajo experimental llevado a cabo con HPLC-UV se han plasmado en el siguiente trabajo, enviado a la revista Journal of Chromatography A y pendiente de aceptación:

Sensitive reversed-phase high-performance liquid chromatographic separation of eight tetracyclines in honey samples

S. Casado-Terrones, A. Carrasco-Pancorbo, A. Segura-Carretero and A. Fernández-Gutiérrez

Department of Analytical Chemistry. Faculty of Sciences, University of Granada. Fuentenueva s/n, E-18071 Granada, Spain

Keywords: Tetracyclines; antibiotics; honey; HPLC

Corresponding author. Tel.: +34 958 243296; fax: +34 958 249510.

E-mail address: albertof@ugr.es (A. Fernández Gutiérrez).

Abstract

Eight antibiotics, chlortetracycline, demeclocycline, doxycycline, methacycline, minocycline, oxytetracycline, tetracycline and rolitetracycline, were separated and quantified in seven Spanish honey extracts of different floral origin using a commercial RP-C18 HPLC column and a diode array detector. Operating a linear gradient at a flow of 2 ml min⁻¹ the HPLC separation of the eight antibiotics was obtained within 10 min with good peak symmetry and an acceptable resolution (2.1) for the critical band pair rolitetracycline and oxitetracycline. Values of the numbers of theoretical plates (N) were comprised between 2328 and 19448 while the limits of detection in honey were within 0.02-1.03 µg kg⁻¹.

1. Introduction

Tetracyclines (TCs) are commonly used antibiotics both for the treatment of infectious diseases and as additive to animal feeds for their broad-spectrum antibacterial activity and cost effectiveness. If recommendations for drug withdrawal are not respected or if veterinary drugs are used unlicensed, there is a significant risk of detecting TCs residues in honey, milk, and some edible animal tissues [1]. As an example of the use of these drugs in beekeeping, we can refer to the fight against two of the worst enemies of the honeybee (*Apis Melifera*), the bacterial diseases American foulbrood (*Bacillus Larvae*) and European foulbrood (*Streptococcus Pluton*) which destroy honeybee larvae.

Prevention is the most desirable way to control these diseases and it can be done by treatment of hives with these substances in spring [2]. Because of easy availability and relatively low cost, this procedure has been widely adopted by beekeepers. Consequently, the honey harvested from hives may be contaminated with residues of these substances, being a potential risk to the consumers in terms of allergic reactions [3] and the development of bacterial resistance [4].

The application of the law in relation to these antibiotics is not harmonised across all member states of the European Union. The Commission of the European Union laid down the procedure for establishing maximum residue limits (MRLs) of veterinary medical products in foodstuffs of animal origin [5]. However, no MRLs have been fixed for using with bee products; nevertheless, some countries, such as Switzerland, have set MRLs for the TCs in honey at 20 µg/kg. There is not any law in Spain about the control of these drugs in honey, although the law related to quality of honey [6] (R.D. 1049/2003) affirms that it is illegal any type of additive or substance apart from honey at any level.

Routine analysis of antibiotics in honey is carried out according to the "classical approach" in two steps [7]. In the first one screening is carried out by the Charm test [8,9] or ELISA [10]. In a second step the residues of the positively tested samples are quantified mostly by HPLC.

In the majority of bibliographic references related to analysis of TCs in honey by HPLC, UV detection is used [2,10-15]; mass spectrometry [16-19], fluorescence [20] and chemiluminescence methods [21] have also been reported.

The present study describes the development of an easy and rapid analytical methodology for the sensitive determination of eight TCs (chlortetracycline (CTC), demeclocycline (DMCC), doxycycline (DC), methacycline (MTC), minocycline (MINO), oxytetracycline (OTC), tetracycline (TC), rolitetracycline (RTC)) in honey samples by HPLC with absorbance detection. As far as we know, this is the first time RTC is determined by HPLC, making this separation the one with more TCs analyzed in honey by HPLC, as well as competing favorably in analysis time and limits of detection (LOD) with HPLC methods existing in bibliography.

Isolation of the analytes from honey was achieved using a mild acidic solution of Na₂EDTA (pH 4), followed by a simple solid-phase extraction (SPE) procedure. Determination of analytes was then performed by HPLC-diode array detection. The developed method has been applied to determine residues of these antibiotics in seven samples of Spanish honeys of different floral origin.

2. Experimental

2.1. Chemicals and solutions

All reagents used were of analytical grade. HPLC grade ACN, methanol and ethyl acetate were purchased from Panreac (Barcelona, Spain). Oxalic acid and EDTA disodium salt dihydrate were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA); sodium hydroxide was from Panreac. Triethylamine (TEA) (99.5%) was from Sigma.

The eight TC antibiotics used were obtained by Sigma. They must be handled with care as they are irritant so that contact with skin must be avoided too. Individual stock standard solutions were prepared in methanol/water (70:30, v/v) due to their solubility are greater than in aqueous solutions, at a concentration of 1000 µg ml⁻¹ and were stored at -4 °C in brown glasses for a maximum period of 2 months. It is necessary to use this amber glassware in

order to prevent photo degradation of TCs. Working standard solutions were prepared daily by dilution of this concentrated solution. Milli-Q water of 18.2 M Ω cm resistivity was used throughout (Millipore, Billerica, MA, USA).

A total of seven honey samples were purchased in different local markets from Granada (Spain) in December 2005. Three of them were multiflower honey, two of rosemary and the other two of orange blossom and eucalyptus. All samples were stored in a dark and dry place at room temperature.

2.2. Instrumentation

Analyses were carried out operating at room temperature on a System Gold HPLC (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA), including a 126 solvent module, a 168 diode array detector module and a manual sample valve injector with a 20 μ l loop (Rheodyne, Cotati, CA, USA). The HPLC column used was a Microsorb-MV C-18 (5 μ m, 150 \times 4.6 mm) fitted with a Microsorb C-18 guard column (Varian Iberica, Madrid, Spain).

Solvents were filtered using a Solvent Filtration Apparatus 58061 (Supelco, Bellefonte, PA, USA) prior to degassification by ultrasonication.

A model MicropH 2002 meter from Crison (Barcelona, Spain) was used to adjust the pH of the mobile phase with a precision of 0.01 pH unit. A Heidolph VV rotary evaporator (Schwabach, Germany) coupled to a Büchi B-169 Vacuum System (Flawill, Switzerland) was used to concentrate the sample extracts. For SPE, a Supelco Preppy vacuum manifold (Bellefonte, PA, USA) and C-18 extraction cartridges from Discovery (Sigma) were used. Finally, as a vortex mixer a G560E Vortex-Genie 2 (Scientific Industries, Bohemia, NY, USA) was used.

2.3. Chromatographic procedure

The eight TCs were separated by the C-18 column at room temperature with a gradient elution program at a flow rate of 2 ml min⁻¹, with observed backpressure values in the range from 169 to 183 kg cm⁻². The mobile phase consisted of 0.02 M oxalic acid/0.01 M TEA (pH 2) (A) and ACN (B). The linear gradient elution program was run from 5 to 32 % B within 10 minutes. The

initial conditions were reestablished in 2 min and held for 5 min. The monitoring of the examined TCs was performed at 360 nm. The chromatogram obtained using this gradient elution program is shown in Fig. 1A. Runtime was about 10 min.

2.4. Sample preparation

A sample of honey (5 g) was dissolved in 15 mL of 0.1 M Na₂EDTA pH 4.0. The solution was stirred for 5 min using a vibratory stirrer at 500 rpm. After filtration it was loaded on a Discovery C-18 (1 g) cartridge previously conditioned with 10 mL of methanol, 10 mL of water and 10 mL of 0.1 M Na₂EDTA solution. The SPE cartridge was then washed with 10 mL of water, and after 5 min of drying with air by aspiration TCs were eluted with 5 mL of ethyl acetate directly in 25 mL volumetric flask. The eluate was evaporated to dryness under reduced pressure at 40 °C. The residue was dissolved in 1 mL of mobile phase, stirred in vortex and filtered before been injected into the HPLC system.

3. Results and discussion

3.1. Optimization of HPLC system

Interaction of TCs with the silanols and trace metals present in silica packings materials significantly contributes to peak tailing and is a widely and often cited complaint of TC chromatography. The numerous double bonds and oxygen or nitrogen substituents of TCs provide for many sites of interaction. In order to minimize these undesirable effects, acidic mobile phases prevail in the literature. The acid acts as a simple ionization suppression agent to minimize the occurrence of mixed separations mechanisms. Toward this end, phosphate buffer, acetate buffer, citric acid, formic acid, acetic acid, o-phosphoric acid, perchloric acid or trifluoroacetic acid have been used. However, the most common acid used is oxalic acid for their additional ability to very effectively mitigate the effect of residual silanols on the stationary phase and perhaps even eliminate residual metals [22,23].

In a first attempt isocratic elution was tested; various percentages (25-50%) of organic modifiers (ACN and methanol) in the mobile phase: 0.01 M oxalic acid (pH 2), were tried. Better results were obtained with ACN (30%) rather

than methanol. Then, concentration of oxalic acid and pH were varied, getting best results at a concentration of 0.02 M at pH 2; higher concentration than 0.02 M entailed loss of resolution (see Fig. 2). pH lower than 2 was not possible since it would be a pH out of the usual pH range for the silica-based column (2-8) and higher than 2 generated loss in resolution. The different retention behavior of the TCs made isocratic elution not possible; overlaps appeared at initial peaks (these early bands require a weaker mobile phase) and excessive retention with the resulting tailing at last ones (these later bands are best separated with a stronger mobile phase). Then, a gradient elution technique was tried.

An initial gradient experiment (from 5 to 100% ACN in a gradient time of 60 min, 2 ml min⁻¹) guided us to estimate the best initial and final values of % ACN: 5 and 32%, respectively [24]. Different gradient steepness was checked: 1.4, 1, 0.75 and 0.5% ACN/min, which correspond with gradient times of 19, 27, 36 and 54 minutes, respectively (see Fig. 3). As long as gradient steepness is reduced (or gradient time is increased), resolution is better. This effect is counterbalanced by a decrease in peak height (due to wider bands) and an increase in run time. The critical pair band RTC/TC starts to be resolved from the 0.75% ACN/min gradient steepness on, but their acceptable separation would require an excessive gradient time with an enormous peak tailing effect. Therefore, it should be noted that gradient elution would not solve by itself all resolution and band-tailing problems. TEA was added to the mobile phase as an additive (at a concentration of 0.01 M) in order to avoid this band tailing, as it is a very common additive used to block silanols groups in reversed-phase chromatography when separating basic analytes [25]. Its favorable effect against the tailing is shown in Fig. 3 (chromatogram on the right), where RTC and TC eventually appeared resolved, and the interaction between residual silanols of silica-based C-18 column and the basic TCs were minimized. All bands are now eluted with narrower bandwidths and better symmetry. Lower concentrations than 0.01 M of TEA involve loss of capacity to block silanols groups and increasing of band-tailing.

Once TEA had eliminated the band-tailing problem, the final step in this method development was trying to reduce analysis time by increasing gradient steepness (or decreasing gradient time). As gradient steepness is increased from 0.75 to 2.7% ACN/min, analysis time is reduced from 24 to 10 min, and retention factors from 33.7 to 9.4. Gradient times lower than 10 min (2.7% ACN/min) entailed loss of resolution between RTC and TC. So the optimal A/B gradient was found to be from 95/5 to 68/32 within 10 minutes, being solvent A, 0.02 M oxalic acid/0.01 M TEA (pH 2) and solvent B, ACN. Some chromatographic parameters, such as peak asymmetry factor or the number of theoretical plates (see Table 1) indicate the positive effect of TEA on the peak tailing and the high efficiency of the column.

The influence of the flow rate was also proved. Higher flow rates than 2 ml min⁻¹ originated tailed broad peaks and a rapid increase of the backpressure. Lower flow rates made run time increased and gave poorer resolution.

It must be emphasized that the analysis is performed at pH 2, a pH at which silica-based materials lack stability, and it was necessary to flush the column with a neutral solvent (e.g. water/ACN, 20/80) for 1 hour at the end of each working day, before storing the column in ACN. This practice contributed markedly to the prolonging of column life. The use of the guard column also provides some protection against decomposition of the column.

3.2. Linearity, sensitivity and precision

Under the optimum conditions described above, working curves of the eight TCs were obtained in a concentration range from the quantification limit to 10 µg ml⁻¹. Each point of the calibration graph corresponded to the mean value from three independent injections. The parameters of the regression equations, LOD and precisions were obtained with standards of TCs (Table 1). The linearity was good, as shown by the fact that correlation coefficients (*r*) are above 0.999 for all the calibration equations.

An evaluation of the sensitivity was made by determining the values of the LOD calculated from the peak area on the basis of $3\sigma/b$, σ being the standard deviation of the blank (largest deviation of detector signal from

baseline measured in a section of about 300 points in the absence of analyte) and b the intercept of every calibration equation. Table 2 shows different HPLC methods existing in bibliography for determining TCs in honey. As it can be inferred from the table, the herein method developed is the most sensitive one and it determines the highest number of TCs in a very competitive separation time.

The precision of the method described was measured as repeatability and reproducibility. The intra- and inter-day repeatability in the peak areas was determined as the RSD obtained for six consecutive injections of each TC at an intermediate concentration value of the calibration curve, carried out within the same day and on three different days. Table 1 shows that acceptable levels of precision were obtained for the developed method in terms of repeatability since in all cases RSDs calculated were lower than 10%. It should be noted that although they are not specified, RSDs for migration times are always lower than the ones for peak areas.

3.3. Application to honey samples: recovery studies

A number of representative Spanish honey samples from different floral origins (three of thousand flower, two of rosemary, one of orange blossom and one of eucalyptus) were previously analyzed by the Charm II screening method in a laboratory specialized in honey analysis [26] in order to know if they showed contamination of TCs. All the antibody assays gave negative results. Thus, the applicability of the present method was checked with these blank honey samples.

The optimization of the extraction and cleanup procedure was recently studied by our research group for an electrophoretic method [27]. The optimum conditions are those presented under *Sample preparation* paragraph. As it can be seen, here the quantity of honey for the extraction procedure was reduced to 5 g because the sensibility obtained in this HPLC method was higher than the one obtained in the CE methodology.

A recovery study was carried out by spiking the seven honey samples (5 g) at four levels of concentration (see Table 3). Recoveries of four of the seven honey samples analyzed are only shown (one sample of each floral origin).

Percentages between 59 and 89% were attained. The RSDs of the measurements ranged from 2.51 to 6.42% (n=3). A typical chromatogram of TCs extracted from spiked samples is shown in Fig. 1B.

4. Conclusions

The procedure can be applied successfully to the rapid and sensitive analysis of TC residues using reversed-phase liquid chromatography with UV detection and gradient elution. The use of TEA in the mobile phase was satisfactory to prevent interaction of TCs with the silanols groups of the stationary phase, thus avoiding the appearance of tailing peaks.

A total of seven samples of Spanish honeys of different botanical origin were examined. None of them showed contamination of the TCs residues at detectable levels. The recovery study carried out led to good results; detection limits in the honey ranging between 0.02 and 1.03 $\mu\text{g kg}^{-1}$, depending on the TC, were the lowest detection limits found in bibliography.

Acknowledgements

The authors are grateful to the Spanish Ministry of Education and Science for two grants (FPU, AP2002-1033 and 1043) and a Project (CTQ2005-01914-BQU) and to Consejería de Agricultura y Pesca of Andalusian Government for the Project C019.

Table 1. Chromatographic and calibration parameters for the TCs separation on the C18 column.

	Chromatographic parameters ^a			Calibration parameters ^d							
	t_R (min)	Symmetry ^b	N ^c	a	b	r	LOD ($\mu\text{g l}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$) ^e	Repeat. Intra-day ^f	Repeat. Inter-day ^f	Reproducibility ^g
MINO	3.27	1	2328	24461	20423	0.999	0.13	0.04	1.60	7.16	6.31
RTC	5.02	1	9772	294.44	705.84	0.999	3.85	1.03	1.71	9.00	7.59
OTC	5.42	1.30	6404	38355	19716	0.999	0.14	0.04	1.80	6.63	8.00
TC	6.08	1.36	5255	65566	41030	0.999	0.07	0.02	0.15	6.37	7.32
DMCC	7.25	1.38	7340	14523	18661	0.999	0.15	0.04	3.33	5.75	9.50
CTC	8.57	1.33	10243	-26872	13697	0.999	0.20	0.05	1.07	7.37	9.88
MTC	9.03	1.34	17999	-6596.70	17949	0.999	0.15	0.04	1.91	7.91	9.10
DC	9.42	1.35	19448	48001	18356	0.999	0.15	0.04	1.15	4.84	7.94

^a Each value of t_R , symmetry and N is the average of $n = 3$ runs.

^b Measured as peak asymmetry factor: $A_s = B/A$, calculated at 10 % of peak height, where A is the distance from peak front to peak maximum, and B is the distance from peak maximum to peak end.

^c Calculated as $N = 5.54 (t_R/W_{1/2})^2$ on the basis of the response of a TCs mixture of $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ for each compound.

^d A (peak area) = $a + b \times C$ ($\mu\text{g ml}^{-1}$) for six points ($n = 3$).

^e Taking into account the recovery percentages of each TC in the extraction process.

^f RSDs values (%) for peak areas corresponding to each TC; measured from six consecutive injection of each analyte within the same day (intra-) and on three different days (inter-).

^g RSDs values (%) from three consecutive injection with two different technicians and within two different days.

Table 2. Detection limit and separation time comparison with other HPLC methods which determine TCs in honey.

TCs analyzed	Detector system	Separation time (≈ min)	LOD	References
TC	UV (360 nm)	- ^a	200 µg/kg	Martel <i>et al.</i> [10]
OTC, TC, MTC	CL (274/350 nm)	11	0.9-5 ng/ml	Wan <i>et al.</i> [21]
OTC, TC	Fluorescence (exc. 385/em. 500 nm)	10	20-21 µg/kg	Pena <i>et al.</i> [20]
TC, OTC, DC, CTC	MS/MS (ESI in positive mode)	11.5	Low µg/kg ^a	Khong <i>et al.</i> [16]
OTC, CTC, TC	MS/MS (ESI in positive mode)	4	25 µg/kg	Alfredsson <i>et al.</i> [17]
TC, OTC, CTC, DC, MINO, MTC	UV (270/355 nm)	22	15-30 ng/g	Viñas <i>et al.</i> [11]
OTC	UV (360 nm)	6.6	25 µg/kg	Pagliuca <i>et al.</i> [12]
OTC, TC, CTC	UV (356/365 nm)	- ^a	12-36 µg/kg	Geertsen <i>et al.</i> [13]
OTC, TC, CTC, DC	MS/MS (APCI in positive mode)	18	1-4 ppb	Nakazawa <i>et al.</i> [18]
OTC, TC, CTC, DC	MS (FAB in positive mode)	50	0.1 ppm	Oka <i>et al.</i> [19]
OTC, TC	UV (285/270 nm)	5	1.2-3 ppm	Galeano <i>et al.</i> [2]
OTC, TC, CTC, DC	UV (350 nm)	6	20-50 ppb	Oka <i>et al.</i> [14]
OTC, TC, CTC, DC, MTC, DMCC, MINO	UV (350 nm)	10	0.05-0.1 ppm	Oka <i>et al.</i> [15]
CTC, DMCC, DC, MTC, MINO, OTC, TC, RTC	UV (360 nm)	10	0.02-1.03 µg/kg	This article

^a Not specified.

Table 3. Recoveries for the determination of the eight TCs in honey samples

	Added ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Recovery % *							
		MINO	RTC	OTC	TC	DMCC	CTC	MTC	DC
Sample 1- multiflower honey	2	69	70	60	59	69	77	65	72
	25	82	73	65	68	75	75	75	70
	50	80	72	61	62	71	82	70	77
	100	80	73	75	77	73	88	70	75
Sample 2- rosemary honey	2	63	72	62	60	68	80	64	69
	25	79	69	64	65	72	89	69	70
	50	82	70	68	69	75	85	69	75
	100	80	75	73	64	73	84	72	73
Sample 3- orange honey	2	60	70	69	73	71	68	65	66
	25	70	75	72	74	70	65	64	70
	50	72	78	71	76	77	75	68	72
	100	74	81	84	75	82	81	65	75
Sample 4- eucalyptus honey	2	62	75	74	65	69	59	62	60
	25	64	78	73	71	75	65	60	62
	50	80	81	75	75	71	67	75	69
	100	88	80	80	88	85	84	88	68

* n=3 for each fortified honey. RSDs were always lower than 10%.

Caption Figures

Figure 1. Chromatographic profiles using the C18 column and gradient elution. Mobile phase, 0.02 M oxalic acid/0.01 M TEA (pH 2) (A) and ACN (B). Gradient elution, from 5 to 32% B within 10 min, at 2 ml min⁻¹. Diode array detection at 360 nm. Volume injection: 20 µl. A) Standards mixture containing 10 µg ml⁻¹ of each TC. The peaks correspond to: 1, minocycline; 2, rolitetracycline; 3, oxitetracycline; 4, tetracycline; 5, demeclocycline; 6, chlorotetracycline; 7, methacycline; 8, doxycycline. B) Eucalyptus honey fortified with 25 µg kg⁻¹ of each TC.

Figure 2. Effect of increasing the concentration of oxalic acid in an isocratic elution with oxalic acid pH 2:ACN (70:30, v:v). Flow rate: 2 ml min⁻¹, absorbance at 360 nm. Mixture of standard TCs at 10 µg ml⁻¹.

Figure 3. A/B gradient separation of the eight TCs from 95/5 to 68/32 as a function of gradient time (t_G) or steepness (% ACN/min); effect of adding TEA to the mobile phase. Solvent A: 0.02 M oxalic acid (pH 2) in all chromatograms except for the one on the right, where solvent A is 0.02 M oxalic acid/0.01 M TEA (pH 2). Solvent B: ACN. Flow rate: 2 ml min⁻¹, absorbance at 360 nm. Mixture of standard TCs at 10 µg ml⁻¹.

Figure 1

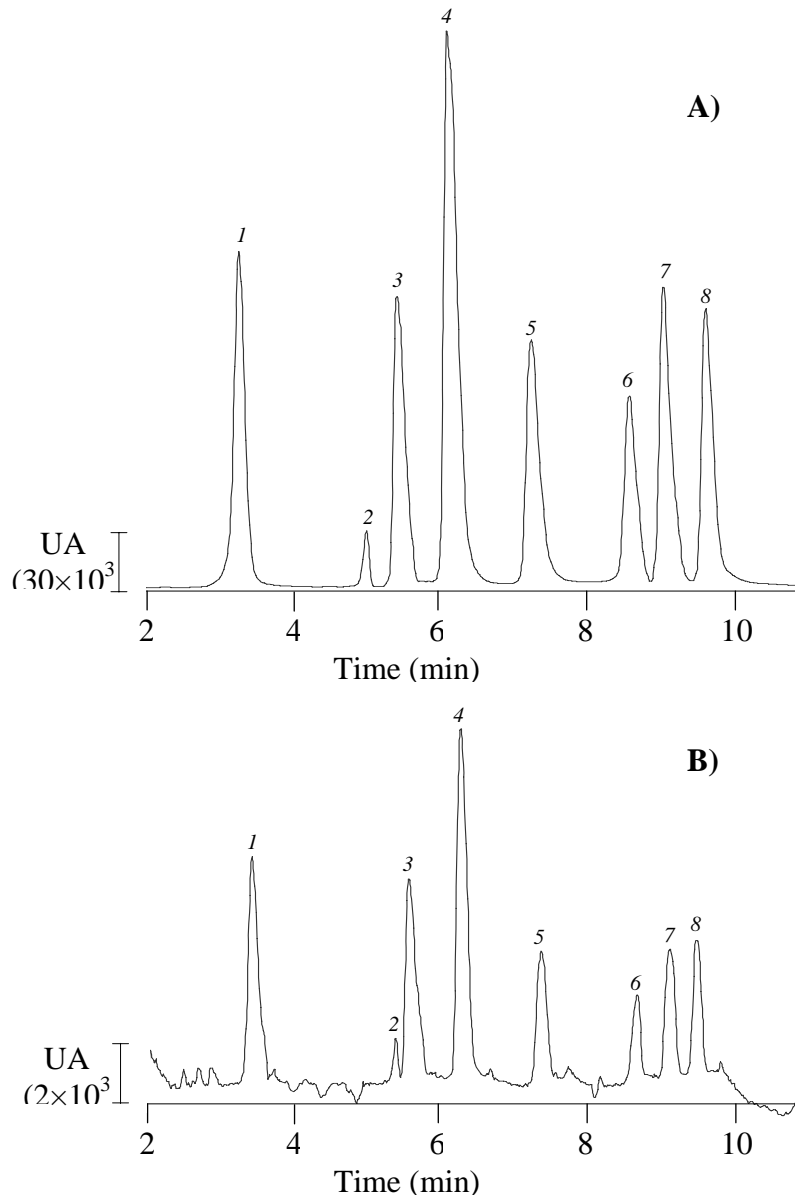


Figure 2

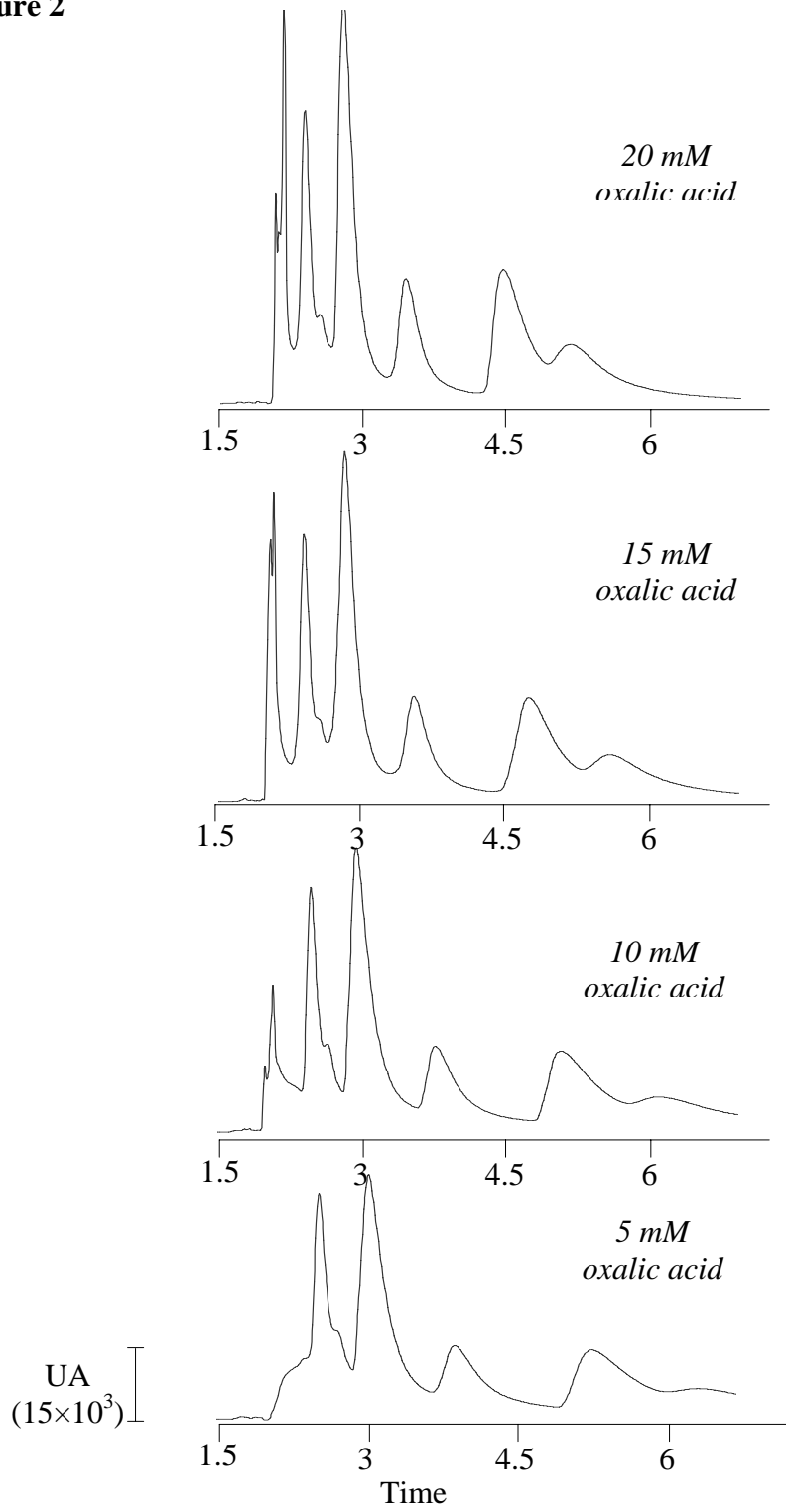
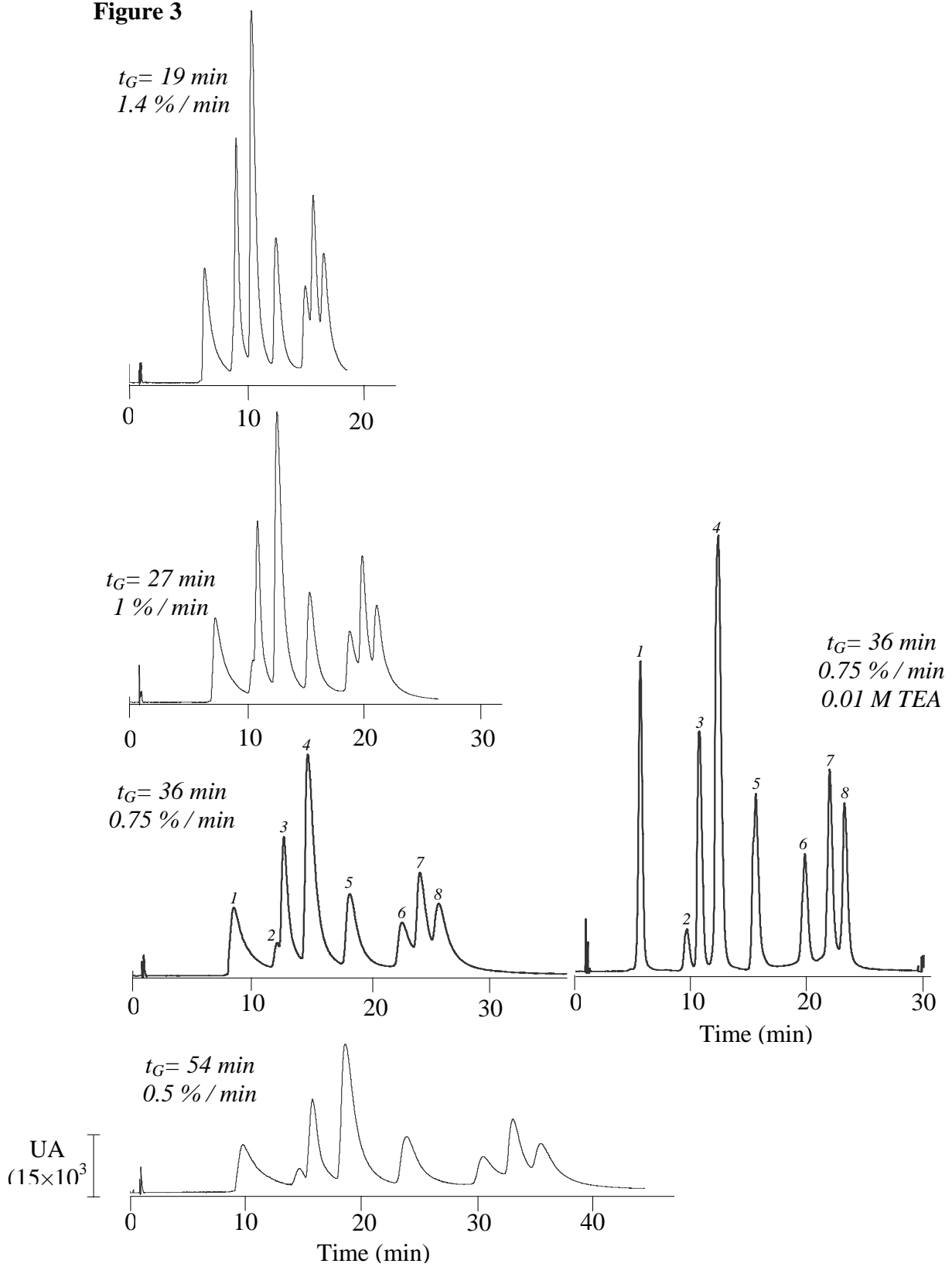


Figure 3



- [1] J.C. Paige, L. Tollefson, M. Miller, *Vet. Hum. Toxicol.* 39 (1997) 162.
- [2] T. Galeano-Díaz, A. Guiberteau-Cabanillas, F. Salinas, *Anal. Lett* 23 (1990) 607.
- [3] World Health Organization. Technical Report Series 430 (1969).
- [4] A.E. Van den Bogaard, E.E. Stobberingh, *Int. J. Antimicrob. Agents* 14 (2000) 327.
- [5] Council Regulation (EEC) No. 2377/90, *Off. J. Eur. Commun.* L224/1 (1990).
- [6] <http://www.boe.es/boe/dias/2003-08-05/pdfs/A30181-30183.pdf>
- [7] S. Bogdanov, *Apidologie* 37 (2006) 1.
- [8] W. Reybroeck, *Apiacta* 38 (2003) 23.
- [9] M. Morlot, P. Beaune, *Apiacta* 38 (2003) 226.
- [10] A.C. Martel, S. Zeggane, P. Drainudel, J.P. Faucon, M. Aubert, *Food Add. and Cont.* 23 (2006) 265.
- [11] P. Viñas, N. Balsalobre, C. López-Erro, M. Hernández-Córdoba, *J. Chromatogr. A* 1022 (2004) 125.
- [12] G. Pagliuca, T. Gazzotti, G. Serra, A.G. Sabatini, *Apidologie* 33 (2002) 583.
- [13] G. Geertsen, B. Pedersen, in L.A. van Ginkel (Editor), *Proceedings of Euroresidue IV Conference. Residues of Veterinary Drugs in Foods.* Veidhoven, The Netherlands, 2000, p. 460.
- [14] H. Oka, Y. Ikai, N. Kawamura, K. Uno, M. Yamada, *J. Chromatogr.* 389 (1987) 417.
- [15] H. Oka, Y. Ikai, N. Kawamura, K. Uno, M. Yamada, *J. Chromatogr.* 400 (1987) 253.
- [16] S-P. Khong, Y-A. Hammel, P.A. Guy, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19 (2005) 493.
- [17] G. Alfredsson, C. Branzell, K. Granelli, A. Lundström, *Anal. Chim. Acta* 529 (2005) 47.
- [18] H. Nakazawa, S. Ino, K. Kato, T. Watanabe, Y. Ito, H. Oka, *J. Chromatogr. B* 732 (1999) 55.
- [19] H. Oka, Y. Ikai, J. Hayakawa, K. Harada, H. Asukabe *et al.*, *J. Agric. Food Chem.* 42 (1994) 2215.
- [20] A. Pena, N. Pelantova, C.M. Lino, M.I.N. Silveira, P. Solich, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 3784.

- [21] G-H. Wan, H. Cui, H-S. Zheng, J. Zhou, L-J. Liu, X-F. Yu, J. Chromatogr. B 824 (2005) 57.
- [22] J.R. Walsh, L.V. Walker, J.J. Webber, J. Chromatogr. 596 (1992) 211.
- [23] H. Oka, Y. Ito, H. Matsumoto, J. Chromatogr. A 882 (2000) 109.
- [24] L.R. Snyder, J.J. Kirkland, J.L. Glajch. Practical HPLC method development. John Wiley & Sons, Inc., New York, 1997.
- [25] R.E. Majors, P.W. Carr, LC GC North America 19 (2001) 124.
- [26] Apinevada Laboratory. Lanjarón, Granada (Spain). www.apinevada.com.
- [27] S. Casado-Terrones, S. Busi, A. Segura-Carretero, G. Dinelli, A. Fernández-Gutiérrez, Electrophoresis 28 (2007) 2882.

High performance liquid chromatography - time of flight - mass spectrometry used to determine tetracyclines in honey samples

La detección UV es la predominante en los trabajos publicados relacionados con análisis de TCs (57%). Sin embargo, en los últimos ocho años el uso de la espectrometría de masas (MS) ha aumentado considerablemente (25%). La detección fluorescente y electroquímica aparecen también pero en un pequeño porcentaje⁶⁷.

A continuación se muestran los datos resultantes de la puesta a punto de un método HPLC-ESI-TOF MS para la determinación de las ocho TCs.

Se utilizaron las mismas condiciones que el método HPLC-UV: fase móvil 0.02 M ácido oxálico/0.01 M TEA (pH 2) (A) y ACN (B) usando un gradiente lineal que va del 5 al 32% de B en 10 minutos.

Los análisis por MS se llevaron a cabo usando el instrumento microTOF™ (Bruker Daltonic, Bremen, Alemania). Los parámetros del espectrómetro de masas se optimizaron mediante experimentos de infusión directa con mezclas de 50 mg/L de las ocho TCs

Se procedió a variar los parámetros del espectrómetro de masas hasta conseguir una buena sensibilidad con razonable resolución (5.000-10.000) en el rango de masas de nuestro interés (50-800 m/z). Los parámetros más importantes que se optimizaron fueron los relativos a la fuente y a la zona de transferencia.

➔ *Parámetros de la fuente*

El principal objetivo de la interfase ESI es crear un spray estable y alcanzar una elevada ionización. Para ello habrá que emplear valores adecuados de la presión del nebulizador y del flujo y temperatura del gas de secado, que dependen del flujo de fase móvil que llegue desde el equipo de HPLC. En la Tabla 4-1 se recogen valores típicos de estos parámetros en función del flujo de entrada:

TABLA 4-1. Valores típicos de los parámetros de la fuente de ionización en función del flujo de entrada

Flujo de entrada ($\mu\text{l}/\text{min}$)	Presión del nebulizador (mbar)	Flujo gas de secado (l/min)	Temperatura gas de secado ($^{\circ}\text{C}$)
1-10	0.4-0.6	2-4	150-200
200-500	1.0-3.0	7-12	180-220

El flujo máximo de entrada al espectrómetro de masas es de unos 300-500 $\mu\text{l}/\text{min}$ (dependiendo de la naturaleza del eluyente y la muestra a analizar) ya que a valores superiores la entrada de disolvente a la cámara de nebulización es excesiva, no da tiempo a evaporarse y se forman gotas que introducen humedad a la zona de transferencia empeorándose la exactitud de la masa. Además esta entrada de gotas de disolvente hace que los valores de presión de vacío no se mantengan constantes. En este caso fue necesario el empleo de un divisor de flujo 1:3 de forma que a la entrada del espectrómetro de masas el flujo se redujo de 2 a 0.67 mL/min. Con este flujo de entrada, teniendo en cuenta los valores recomendados en la Tabla 4-1 y observando que la presión del alto vacío se mantuviera constante, se optimizaron las condiciones de la fuente de ionización que resultaron ser:

- Presión del gas de nebulización: 2.5 mbar
- Flujo del gas de nebulización: 9.6 l/min
- Temperatura: 180 $^{\circ}\text{C}$.

Con estos valores se conseguían presiones de alto vacío constantes y en el rango de $2 \text{ a } 3 \cdot 10^{-7}$ bar.

En cuanto a los voltajes en la cámara de nebulización y a la entrada del capilar, se mantuvieron constantes en estos valores en polaridad negativa:

- End Plate offset: -500 V (500 V en polaridad positiva).
- Capillary: 4000 V (-4000 V en polaridad positiva).

⇒ Parámetros de la zona de transferencia

Se trata de una serie de voltajes y radiofrecuencias que se aplican en la zona de transferencia iónica a los diferentes skimmers, hexapolos y lentes. Para asegurar una buena optimización, ésta se debe llevar a cabo en la dirección de entrada de los iones. Como norma general se puede decir que iones con altos valores m/z requieren altos voltajes para ser transmitidos.

Los parámetros más importantes a optimizar son el *capillary exit*, *skimmer 1*, *hexapole RF*, *transfer time* y *prepulse storage time*.

Los voltajes a la salida del capilar de vidrio y a la entrada del primer skimmer 1 son muy importantes, porque cuanto mayor sea su valor mejor se transfieren los iones de masas grandes. Sin embargo, valores elevados pueden producir fragmentaciones que no nos interesen. Los valores optimizados para estos parámetros fueron:

- *capillary exit*: -120 V
- *skimmer 1*: -40 V

Normalmente el voltaje del *skimmer 1* es 3 veces más pequeño que el del *capillary exit*.

La radiofrecuencia del hexapolo (*hexapole RF*) se aplica a ambos hexapolos y tiene una alta influencia en el rango de masas que se transmite a través del camino óptico. Puesto que nuestro interés está en el rango de masas en torno a 400 m/z seleccionamos una radiofrecuencia de 200 Vpp.

Para terminar de confinar el rango de masas de nuestro interés seleccionamos los valores adecuados de *transfer time* y *prepulse storage time*:

- *transfer time*: 45 μs (límite de masas altas)
- *prepulse storage*: 18 μs (límite de masas bajas)

Los voltajes del skimmer 2, hexapolos (1 y 2) y lentes (1, 2, 3, 4 y 5) influyen en la intensidad y la resolución, empleándose los siguientes valores en el método optimizado:

Hexapole 1: -24.6 V

Skimmer 2: -24 V

Hexapole 2: -22 V

Lens 1 Storage: -35 V

Lens 1 extraction: -20.3 V

Lens 2: -8.2 V

Lens 3: 22 V

Lens 4: 0 V

Lens 5: 15 V

➔ *Calibración del espectrómetro*

Para conseguir la exactitud de masas necesaria que permitiera la identificación de los compuestos se utilizó calibración interna. Para el rango de masas que se quería detectar (50-800 m/z) interesaba elegir un calibrante que diera un gran número de puntos en la zona de masas media. Los calibrantes más empleados son el *tune mix* (300-3000 m/z), el formiato de sodio (50-1200 m/z) y el formiato de litio (50-700 m/z). Finalmente se eligió el formiato de litio por ser el que cubría mejor el rango de masas de los analitos en estudio, usando una disolución de 10 mM de hidróxido de litio en isopropanol:agua (1:1 v/v) con el 0.2% de ácido fórmico.

➔ *Análisis espectrométrico de estándares*

En las Tablas 4-2 y 4-3 se muestran las señales teóricas, tanto en modalidad positiva como en modalidad negativa respectivamente, y las obtenidas experimentalmente.

Nos pareció muy interesante llevar a cabo la detección usando polaridad positiva y negativa; de este modo podríamos comparar las señales m/z obtenidas en cada caso, estudiar las fragmentaciones o presencia de aductos y dímeros, controlar la eficiencia de la ionización para cada TC en cada polaridad, etc.

TABLA 4-2. Señales obtenidas en modalidad negativa

Analito	[M-H] ⁻ m/z teórica	Señal m/z experimental (polaridad negativa)
<i>MINO</i>	456.1776	456.1765 / 568.1513 / 658.1393
<i>RTC</i>	*	459.1384 / 546.8415
<i>OTC</i>	459.1409	459.1398 / 571.1160 / 677.0816
<i>TC</i>	443.1460	443.1438 / 426.1271 [443-NH3] ⁻ / 400.1142 [443-HN=C=O] ⁻ / 555.1213 / 645.1107 / 661.0885
<i>DMCC</i>	463.0914	463.0895 / 575.0694 / 681.0347
<i>CTC</i>	477.1070	477.1073 / 460.0781 (477-NH3) / 695.0490 / 767.4996
<i>MTC</i>	441.1303	441.1285 / 424.0994 (441-NH3) / 553.1066 / 659.0723
<i>DC</i>	443.1460	443.1428 / 426.1125 (443-NH3) / 400.1337 (443-HN=C=O) / 555.1212 / 661.0859

* Tras los estudios preliminares, comprobamos que la RTC no generaba ninguna señal correspondiente a [M-H]⁻, por eso no incluimos dicho valor teórico en la tabla.

TABLA 4-3. Señales obtenidas en modalidad positiva

Analito	[M+H] ⁺ m/z teórica	Señal m/z experimental (polaridad positiva)
<i>MINO</i>	458.1922	458.1946 / 441.1662 (458-NH3) / 480.1793 (458+Na) / 496.1526 (458+K) / 915.3989 (2M+H)
<i>RTC</i>	*	461.1607 / 453.2055 / 598.3224 / 729.1361
<i>OTC</i>	461.1555	426.1172 (461-35) / 461.1584 / 444.1253 (461-NH3) / 780.2272 / 943.3098
<i>TC</i>	445.1605	410.1215 (445-35) / 445.1632 / 428.1404 (445-NH3) / 764.2286 / 889.3356 (2M+H)
<i>DMCC</i>	465.1059	448.0815 (465-NH3) / 465.1097 / 430.0670 (465-35) / 784.1779 / 951.2187
<i>CTC</i>	479.1216	479.1263 / 462.0992 (479-NH3) / 444.0855 (479-35) / 426.1085 / 517.0838 / 598.3283 / 798.1976
<i>MTC</i>	443.1449	426.1208 (443-NH3) / 443.1457 / 762.2139
<i>DC</i>	445.1605	428.1354 (445-NH3) / 445.1613 / 410.1191 (445-35)

*Tras los estudios preliminares, comprobamos que la RTC no generaba ninguna señal correspondiente a [M+H]⁺, por eso no incluimos dicho valor teórico en la tabla.

Los datos que se recogían de las masas exactas de los iones analizados se procesaban con el software DataAnalysis 3.3 (Bruker Daltonik GmbH), que ofrece al analista una lista de posibles fórmulas moleculares usando el editor GenerateMolecularFormula™. El umbral de exactitud que se acepta normalmente para la confirmación de fórmulas moleculares se ha establecido en 5 ppm.

Así, en las Tablas 4-4 y 4-5 se incluye cada compuesto estudiado, su m/z experimental y calculado, error, valor sigma, tolerancia y la posición que ocupaba el mismo en la lista de posibilidades que genera el editor GenerateMolecularFormula™ ordenadas atendiendo al valor de sigma. Al igual que antes, la información aparece separada en dos tablas, una para polaridad negativa y otra para la polaridad positiva.

TABLA 4-4. *m/z* teórica y experimental, error, sigma value, tolerancia y clasificación en GMF llevando a cabo la detección en modalidad negativa

Analito	<i>m/z</i> teórica [M-H] ⁻	<i>m/z</i> experimental	Fórmula en GenerateMolecularFormula (GMF)	Error (ppm)	Sigma Value	Tolerancia (ppm)	Clasificación posibles fórmulas
MINO	456.1776	456.1754	C ₂₃ H ₂₆ N ₃ O ₇	4.820	0.0341	10	1° (1)
RTC	493.1854*	459.1391	C ₂₆ H ₂₃ N ₂ O ₆ (459.1362)	6.316	0.0234	100	(2)
			C ₂₅ H ₁₉ N ₂ O ₇ (459.1198)	42.035	0.0252		
OTC	459.1409	459.1397	C ₂₂ H ₂₃ N ₂ O ₉	2.652	0.0036	10	1° (9)
TC	443.1460	443.1438	C ₂₂ H ₂₃ N ₂ O ₈	4.854	0.0197	10	1° (7)
DMCC	463.0914	463.0895	C ₂₁ H ₂₀ ClN ₂ O ₈	3.937	0.0241	10	1° (5)
CTC	477.1070	477.1053	C ₂₂ H ₂₂ ClN ₂ O ₈	3.664	0.0063	10	1° (5)
MTC	441.1303	441.1285	C ₂₂ H ₂₁ N ₂ O ₈	4.169	0.0076	10	1° (7)
DC	443.1460	443.138	C ₂₂ H ₂₃ N ₂ O ₈	1.805	0.0048	10	1° (7)

* En todos los casos, el dato que se incluye en la columna *m/z* teórica corresponde al ión [M-H]⁻; excepto en el caso de RTC, analito que generaba una señal más intensa para un ión distinto al [M-H]⁻.

TABLA 4-5. *m/z* teórica y experimental, error, sigma value, tolerancia y clasificación en GMF llevando a cabo la detección en modalidad positiva

Analito	<i>m/z</i> teórica [M+H] ⁺	<i>m/z</i> experimental	Fórmula en GenerateMolecularFormula (GMF)	Error (ppm)	Sigma Value	Tolerancia (ppm)	Clasificación posibles fórmulas
MINO	458.1922	458.1946	C ₂₃ H ₂₈ N ₃ O ₇	-5.305	0.0168	10	1° (6)
RTC	495.200*	461.1698	C ₂₆ H ₂₅ N ₂ O ₇ (461.1707) C ₂₅ H ₂₁ N ₂ O ₇ (461.1343)	-1.952 76.978	0.034 0.087	100	(2)
OTC	461.1555	461.1565	C ₂₂ H ₂₅ N ₂ O ₉	-2.168	0.0251	10	1° (8)
TC	445.1605	445.1612	C ₂₂ H ₂₅ N ₂ O ₈	-1.572	0.0345	10	1° (6)
DMCC	465.1059	465.1083	C ₂₁ H ₂₂ ClN ₂ O ₈	-5.199	0.0149	10	1° (11)
CTC	479.1216	479.1223	C ₂₂ H ₂₄ ClN ₂ O ₈	-1.461	0.0239	10	1° (15)
MTC	443.1449	443.1457	C ₂₂ H ₂₃ N ₂ O ₈	-1.815	0.0019	10	1° (7)
DC	445.1605	445.1613	C ₂₂ H ₂₅ N ₂ O ₈	-1.630	0.0544	10	1° (6)

* En todos los casos, el dato que se incluye en la columna *m/z* teórica corresponde al ión [M+H]⁺, excepto en el caso de RTC, analito que generaba una señal más intensa para un ión distinto al [M+H]⁺.

La Figura 4-1 muestra el BPC (Base Peak Chromatogram o cromatograma del pico base) para el rango de masas estudiado (50-800 m/z) de una mezcla de las ocho TCs en metanol.

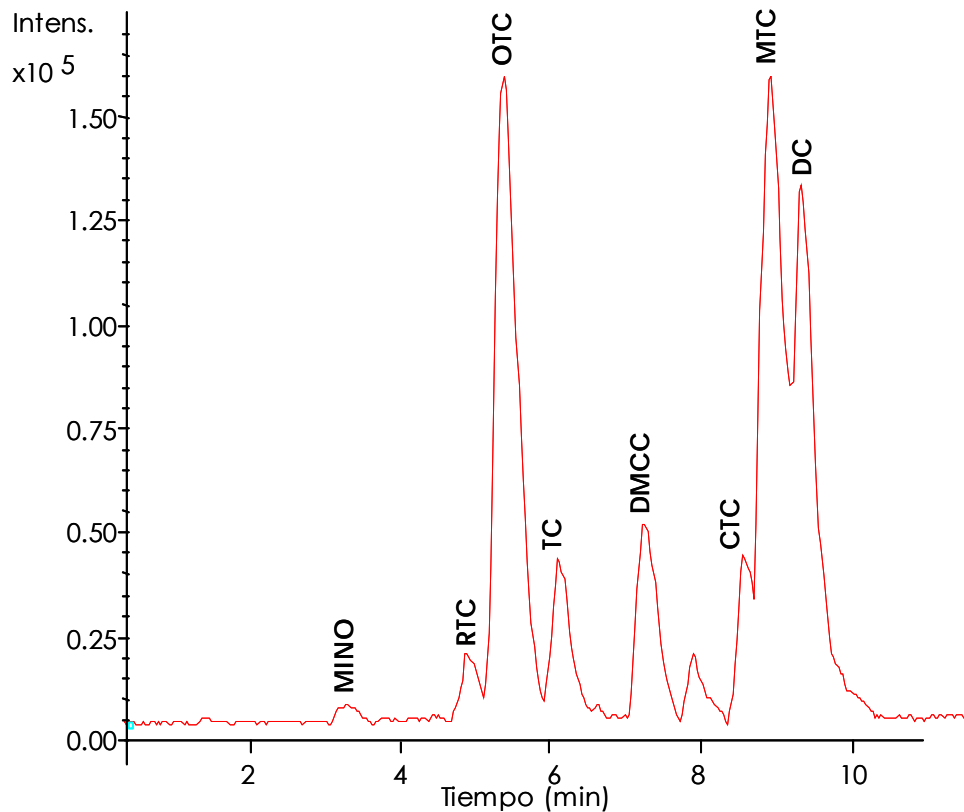


Figura 4-1. Cromatograma del pico base (BPC) (m/z 50-800) obtenido mediante HPLC-ESI-TOF MS para una mezcla de las 8 TCs a 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Detección en polaridad negativa

La siguiente Figura 4-2 muestra los cromatogramas de los iones extraídos (EIC) para los ocho antibióticos que formaban parte de la mezcla de analitos estudiada. Para cada compuesto mostramos junto al EIC la señal m/z experimental ± 0.003 a la que corresponde, cosa que, viendo el margen de error tan pequeño que toleramos (± 0.003), nos da idea de la calidad de las medidas que se llevaron a cabo. Vale la pena comentar que en el caso del EIC 459.139 ± 0.003 se ven dos picos; este hecho no es de extrañar, ya

que hay dos compuestos que dan exactamente la misma señal en el espectrómetro de masas (RTC y OTC). Asimismo, en el EIC correspondiente a 443.144 ± 0.003 se ven otros dos picos, lo que es lógica al ser idénticas sus fórmulas moleculares. Es también normal poder detectar pequeños picos acompañando a DMCC (463.090 ± 0.003) y CTC (477.107 ± 0.003); dichos picos pueden corresponder a aductos u otros posibles fragmentos que aparecen en muy pequeña proporción cuando se ionizan otros de los compuestos presentes en la mezcla.

Capítulo 4

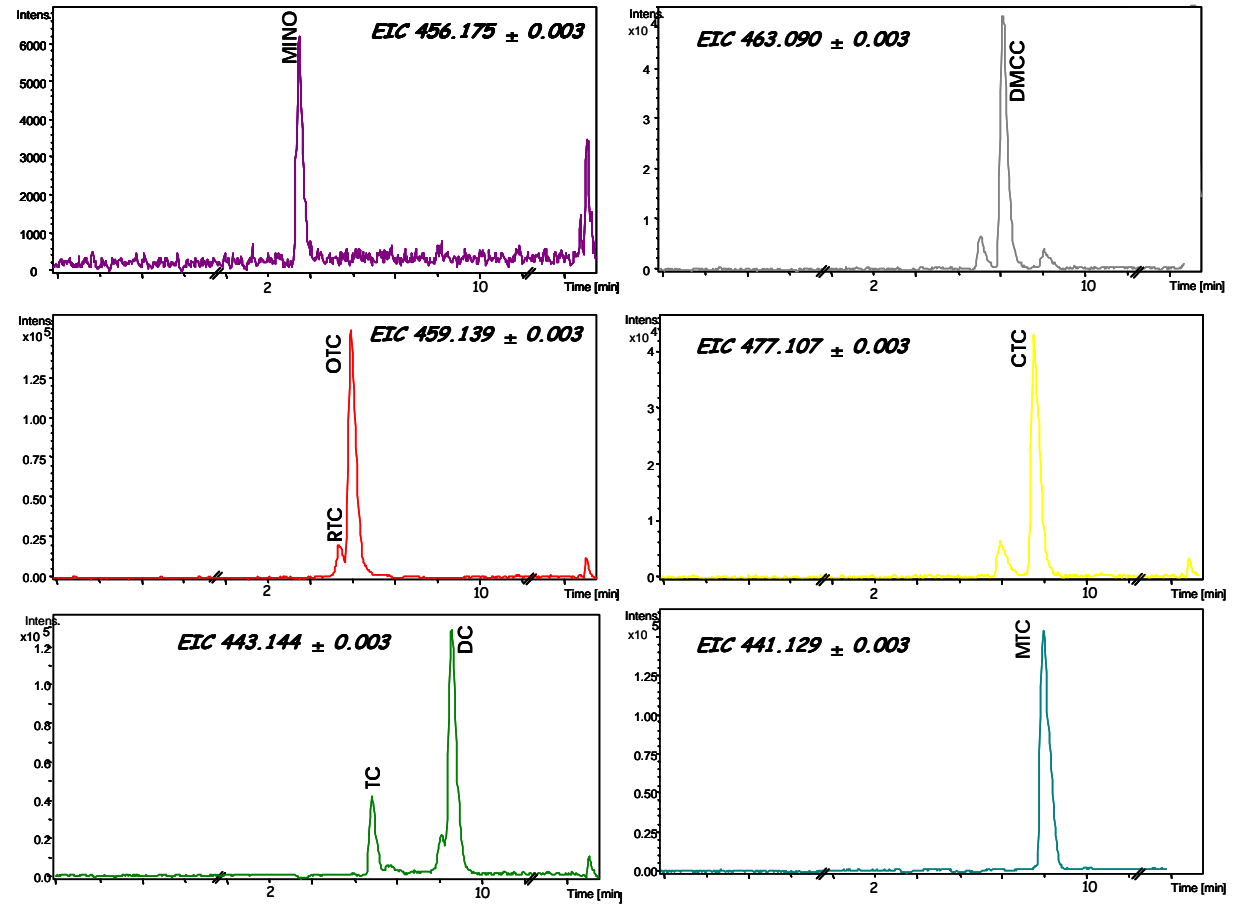


Figura 4-2. Cromatogramas de los iones extraídos (EIC) en modalidad negativa correspondientes al BPC de la Figura 4-1

La Figura 4-3 muestra el BPC para el rango de masas estudiado (50-800 m/z) de una mezcla de las ocho TCs en metanol llevando a cabo la detección en polaridad positiva. Observando el eje de Intensidad, podemos ver cómo algunos de los analitos cambian completamente su respuesta en el espectrómetro de masas atendiendo a la polaridad elegida; es especialmente notable el caso de la minociclina, que estando a la misma concentración en la mezcla estudiada, genera una señal mucho más intensa al ser estudiada en polaridad positiva.

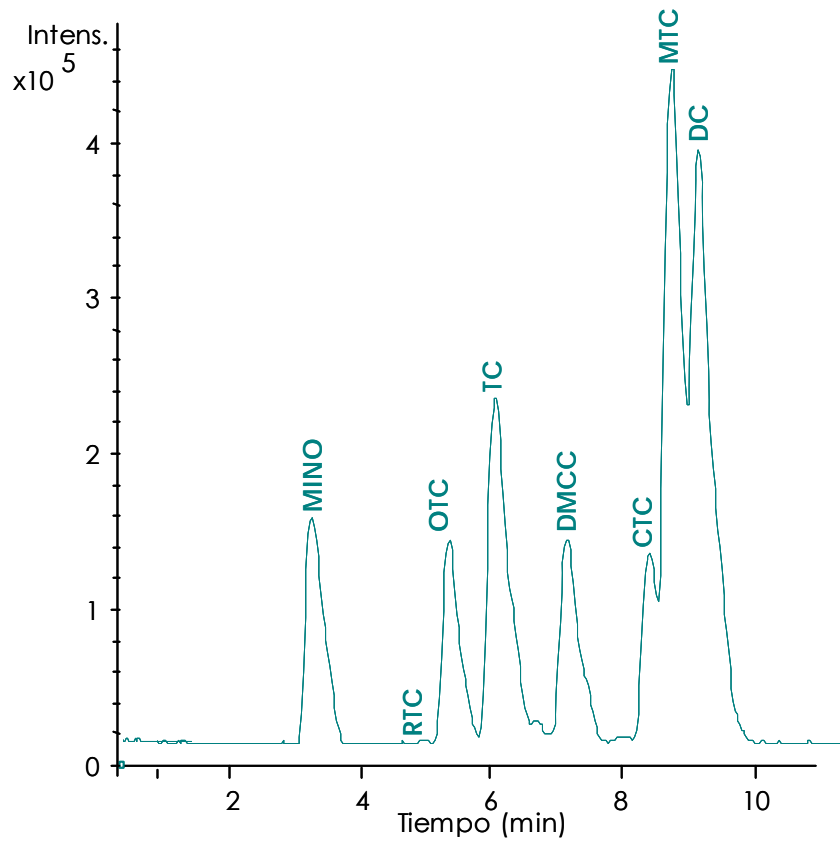


Figura 4-3. Cromatograma del pico base (BPC) (m/z 50-800) obtenido mediante HPLC-ESI-TOF MS para una mezcla de las 8 TCs a 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Detección en polaridad positiva

Al igual que hicimos anteriormente, la Figura 4-4 muestra los cromatogramas de los iones extraídos obtenidos en polaridad positiva para los ocho antibióticos que formaban parte de la mezcla de analitos estudiada.

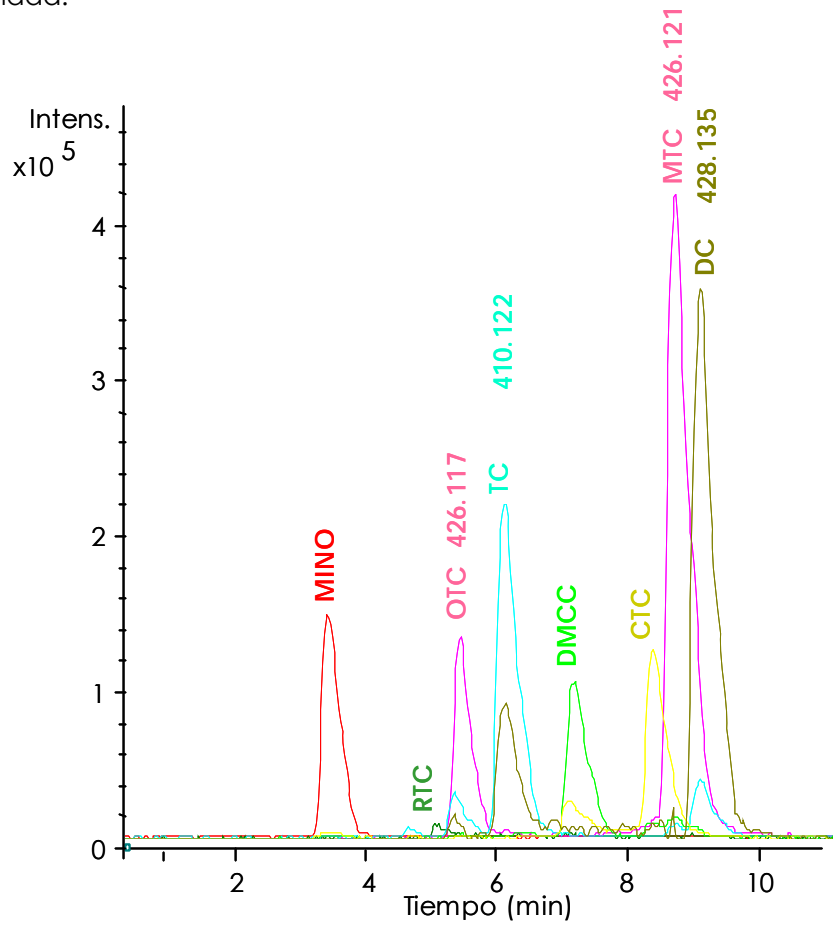


Figura 4-4. Suma de los iones extraídos que se observan en el BPC de la mezcla de las 8 TCs en polaridad positiva. Cuando no se indica lo contrario, el EIC representado corresponde a $[M+H]^+$ (ver Tabla 4-3 de fragmentaciones)

➔ *Parámetros analíticos*

Uno de los aspectos analíticos más importantes de un método es la capacidad del mismo para llevar a cabo la cuantificación. En este caso, se procedió a realizar rectas de calibrado para cada una de las 8 TCs (cinco puntos, tres réplicas de cada uno). Los parámetros analíticos se muestran en la Tabla 4-6, tanto para la detección en modalidad positiva como en negativa, incluyendo el límite de detección ($\mu\text{g/l}$ y $\mu\text{g/kg}$ teniendo en cuenta el método de extracción de estos compuestos en miel), la ecuación de la recta de calibrado, el ión considerado para realizar la cuantificación y el coeficiente de determinación.

TABLA 4-6. Parámetros analíticos del método HPLC-ESI-TOF MS desarrollado

POLARIDAD POSITIVA	Límite de detección (µg/l)	Límite de detección (µg/kg)	Recta de calibrado*	Ión considerado en cuantificación	r²
<i>MINO</i>	75.9	20.5	$y = 19701x + 1000$	458	0,9936
<i>RTC</i>	3125.0	838.9	$y = 968,28x + 121$	453	0,9942
<i>OTC</i>	75.2	21.4	$y = 16254x + 236,65$	426	0,9976
<i>TC</i>	51.1	14.6	$y = 32772x + 9617,4$	410	0,9916
<i>DMCC</i>	206.3	56.1	$y = 18533x + 25155$	448	0,9901
<i>CTC</i>	81.1	21.2	$y = 17951x + 35129$	479	0,9989
<i>MTC</i>	23.8	6.9	$y = 65808x + 74714$	426	0,9932
<i>DC</i>	29.1	8.3	$y = 62016x - 114562$	428	0,9890

POLARIDAD NEGATIVA	Límite de detección (µg/l)	Límite de detección (µg/kg)	Recta de calibrado*	Ión considerado en cuantificación	r²
<i>MINO</i>	955.4	257.9	$y = 587,69x + 125$	456	0,9889
<i>RTC</i>	487.8	130.9	$y = 1887,6x + 123,12$	459	0,9901
<i>OTC</i>	59.2	16.8	$y = 19679x + 1231,8$	459	0,9965
<i>TC</i>	355.5	101.4	$y = 4482,8x - 1077,8$	443	0,9957
<i>DMCC</i>	149.6	40.7	$y = 6081,5x - 1358,5$	463	0,9988
<i>CTC</i>	154.3	40.3	$y = 5544,2x - 3614,5$	477	0,9913
<i>MTC</i>	94.6	27.5	$y = 22243x - 9886,2$	441	0,9924
<i>DC</i>	116.8	33.3	$y = 15386x - 31757$	443	0,9942

* El rango de calibrado fue desde el límite de cuantificación hasta 10 µg/mL.

En polaridad positiva, los límites de detección se hallaron en el rango entre 4.8 y 625 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de MTC y RTC respectivamente. Sin embargo, al realizar la detección en polaridad negativa, estos oscilaron entre 16.8 y 257.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para OTC y MINO respectivamente. Todas las rectas de calibrado mostraron buenos valores de r^2 en el rango estudiado. El ión considerado en cada caso para llevar a cabo la cuantificación, fue el más abundante en el espectro de masas de cada TC.

Los resultados obtenidos del trabajo experimental se pueden resumir en:

1. Se ha desarrollado un método electroforético zonal que permite la identificación y cuantificación de ocho tetraciclinas en mieles. El método utiliza una disolución reguladora de borato sódico 150 mM a pH 9.8 y 2.5% de 2-propanol e inyección hidrodinámica de 15 s, siendo el voltaje aplicado de 25 kV. Con estas condiciones se separan los ocho antibióticos en menos de 16 minutos y se cuantifican a 360 nm.

La aplicación de este método electroforético se realizó con siete muestras de mieles españolas de diferentes orígenes florales. Para ello se puso a punto una extracción en fase sólida para la extracción de las tetraciclinas de las muestras de miel. Este método hace uso de un cartucho de 1 g de C-18, del que se consiguen eluir los analitos con acetato de etilo. Se consiguen porcentajes de recuperación que oscilan entre el 55 y el 89%, para muestras dopadas, puesto que ninguna de las muestras de miel usadas estaba contaminada con estos antibióticos.

Se consiguen límites de detección que van desde 23.9 a 49.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Los estudios de repetibilidad (*inter-day* e *intra-day*) y reproducibilidad muestran que el método es preciso ya que las desviaciones estándares relativas no superan en ningún caso el 9.97%.

2. Se ha puesto a punto un método rápido y sensible de HPLC-UV para la determinación y cuantificación de la misma familia de antibióticos determinada con el anterior método electroforético en muestras de miel. Las ocho tetraciclinas se separan en una columna C-18 de 150x4.6 mm a un flujo de 2 mL/min. La fase móvil consiste en 0.02 M ácido oxálico/0.01 M TEA (pH 2) (A) y ACN (B). El gradiente lineal va del 5 al 32% de B en 10 minutos. Con estas condiciones se consiguen separar las ocho tetraciclinas en menos de 10 minutos y con límites de detección (0.02 – 1.03 $\mu\text{g}/\text{kg}$) que mejoran los existentes en bibliografía.

3. Se ha puesto a punto la detección por espectrometría de masas de tiempo de vuelo para el anterior método cromatográfico. Este detector facilita en gran medida la identificación de las especies bajo estudio por la determinación exacta de pesos moleculares. Por esta razón se acopló el equipo de HPLC al analizador MicroTOF™ con la interfase ESI y se desarrolló un método HPLC-ESI-TOF MS que permite profundizar en el estudio de las tetraciclinas con la realización de análisis tanto en modalidad positiva como en negativa facilitando la identificación como inequívoca de las mismas sobre todo y especialmente en muestras complejas donde el sistema de extracción no es selectivo o se producen ligeros cambios en el tiempo de migración.

Conclusiones

Las principales conclusiones derivadas de la investigación descrita en la presente Tesis Doctoral se pueden resumir en los siguientes apartados:

1. Se ha llevado a cabo un estudio comparativo de tres métodos fosforimétricos para la determinación de nafazolina (NFZ) en solución. El primer método se basa en el uso de micelas para estabilizar la señal fosforescente en disolución a temperatura ambiente (MS-RTP). El segundo en el uso de una sal de átomo pesado (KI) y de sulfito sódico como desoxigenante para obtener fosforescencia a temperatura ambiente (HAI-RTP) en solución. El último método emplea un sensor óptico para la NFZ basado en las propiedades fosforescentes del analito en la fase sensora. Se ha realizado la comparativa en cuanto al consumo de tiempo, simplicidad, sensibilidad, selectividad, límites de detección y cuantificación para los tres métodos determinando NFZ en preparados farmacéuticos. Se consiguen límites de detección de 4.9, 1.7 y 9.4 ng/mL, para el método MS-RTP, HAI-RTP y el optosensor, respectivamente, y el más simple, sensible y reproducible de los tres métodos es el HAI-RTP.

2. Se ha desarrollado un sensor óptico para la determinación y cuantificación de NFZ basado en las propiedades fluorescentes que presenta este compuesto. Para ello se ha colocado una resina no iónica (Amberlita XAD7) en una celda de flujo, en el camino óptico de la radiación de excitación dentro del espectrofluorímetro y se ha medido la señal fluorescente a 294/326 nm. El tiempo de respuesta para este sensor es rápido, 80 s, obteniéndose límites de detección de 2.6 ng/mL con unas desviaciones estándares del 2.0% a un nivel de concentración de 125 ng/mL. Este optosensor se ha aplicado satisfactoriamente a dos preparados farmacéuticos (Colirio Alfa y Euboral Oftálmico) que contenían NFZ. Las ventajas de este dispositivo se han comparado con las del único sensor existente para NFZ (el referenciado en el anterior punto) y con otros métodos publicados en bibliografía para determinación de NFZ.

3. Se han puesto a punto dos optosensores luminiscentes (fluorescente y fosforescente) para la determinación de la fitohormona ácido 2-naftoxiacético (β -NOA). Ambos sensores son rápidos (tiempo de respuesta de 150 y 90 s, respectivamente) y sencillos. El optosensor fluorescente se basa en la inmovilización del β -NOA en una resina no iónica (Amberlita XAD7) en un sistema FIA (10 mM glicina/HCl a pH 2.5) y el optosensor fosforescente en la inmovilización del β -NOA en gel de sílica en un sistema de 175 mM TINO_3 y 10 mM Na_2SO_3 . Las intensidades fluorescentes y fosforescentes se miden a 328/348 nm y 276/516 nm, respectivamente. Con el optosensor fluorescente se consigue obtener un intervalo lineal de 2 a 225 ng/mL, con un límite de detección de 2 ng/mL y una desviación estándar de 2.8% a 125 ng/mL, y para el optosensor fosforescente el intervalo lineal es de 4.9 a 250.0 ng/mL, con un límite de detección de 4.9 ng/mL y una desviación estándar de 2.2% a 150 ng/mL. Además, el estudio de aplicabilidad consigue porcentajes de recuperación en torno al 100% con desviaciones estándares menores al 2.2%.

4. Un nuevo complejo de Ag-Au basado en el ligando 2,2'-bipiridina, cuya fórmula es $\{\text{Au}_2\text{Ag}_2(\text{C}_6\text{F}_5)_4[(\text{C}_5\text{H}_4\text{N})-(\text{C}_5\text{H}_4\text{N})]_2\}_n$, se ha usado en un optodo para detectar compuestos orgánicos volátiles (VOCs) tales como etanol, metanol y ácido acético. Este material vapocrómico se presenta como un polvo amarillo que sufre cambios en sus propiedades ópticas cuando se expone a los VOCs objeto de estudio. El sensor de fibra óptica desarrollado se basa en las propiedades de este nuevo compuesto vapocrómico. El optodo trabaja con configuración en reflexión y consiste en fibra óptica (núcleo de 200 μm y recubrimiento de 230 μm) en cuyo extremo se deposita el material vapocrómico, disuelto previamente en un disolvente comercial (Liquicoat ®), mediante la técnica de deposición *dip-coating*. Usando un LED y un fotodetector es posible detectar y cuantificar el cambio en la señal óptica recibida cuando el sensor se expone a los VOCs dentro de una cámara sellada. Este cambio en la señal se relaciona con la concentración

de VOC. Se alcanzan límites de detección de 2.16, 1.73 y 3.73 mg/L para vapores de etanol, metanol y ácido acético respectivamente.

5. Dos instrumentos de CE, uno comercial y otro *homemade* se han comparado para la determinación de aminas y aminoácidos derivados con FITC. El sistema comercial usa una fuente láser de ión argón como fuente de excitación. Por el contrario, el sistema *homemade* hace uso de un LED para excitar y una CCD como sistema detector. En ambos sistemas se pone a punto un método electroforético que usa 0.001% de HDB como modificador del EOF, 50 mM de borato a pH 9.3 con 20% 2-propanol. Se realizó un estudio comparativo de las características analíticas entre ambos sistemas, aplicabilidad en muestras de cerveza, y otros aspectos tales como coste o posibilidad de miniaturización.

6. Se han experimentado dos sistemas detectores para CE, uno de ellos basado en un LED y una CCD (LED-IF-CE), y otro que usa una lámpara de Xe de un espectrofluorímetro convencional con un tubo fotomultiplicador (Xe lamp-IF-CE), para la determinación de las proteínas fluorescentes R- y B-ficoeritrina. Después de una optimización de parámetros ópticos y electroforéticos, se puso a punto una metodología electroforética en zona con 50 mM de borato pH 8.4 y 10 mM de ácido fítico. Se alcanzan límites de detección de 0.50 y 0.64 µg/mL para la R- y B-ficoeritrina, respectivamente con el sistema LED-IF-CE; y 2.73 y 2.16 µg/mL para ambas proteínas de forma similar con el sistema Xe lamp-IF-CE. Se hace un extenso estudio comparativo entre ambos sistemas (parámetros analíticos, coste, miniaturización, etc.).

7. Se ha desarrollado un método electroforético para determinar ocho tetraciclinas en miel (clorotetraciclina, demeclociclina, doxiciclina, metaciclina, minociclina, oxitetraciclina, tetraciclina y rolitetraciclina). La disolución reguladora de separación es 150 mM borato pH 9.8) y 2.5% de 2-propanol con 15 s de inyección hidrodinámica a 25 kV. También se ha puesto a punto un proceso de extracción en fase sólida con cartuchos de

Conclusiones

C-18 que consigue porcentajes de recuperación de entre el 55 y el 89%. Los antibióticos se detectan a 360 nm en menos de 16 min. Los límites de detección van desde 23.9 µg/kg para la tetraciclina hasta 49.3 µg/kg para la rolitetraciclina. Siete muestras comerciales de mieles españolas de distinto origen floral se han estudiado, no presentando ninguna de ellas contaminación por estos antibióticos.

8. Se consiguen separar y cuantificar ocho antibióticos (clorotetraciclina, demeclociclina, doxiciclina, metaciclina, minociclina, oxitetraciclina, tetraciclina y rolitetraciclina) en muestras de miel usando un método de HPLC en fase reversa y detección fotométrica. Usando un gradiente lineal a 2 mL/min la separación de los ocho antibióticos se lleva a cabo en 10 minutos con buena simetría de pico y una resolución aceptable (2.1) para el par de analitos crítico (rolitetraciclina y oxitetraciclina). Se consiguen números de platos teóricos entre 2328 y 19448, y unos límites de detección en miel entre 0.02-1.03 µg/kg.

9. Se ha optimizado un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo para su uso como detector para el método cromatográfico desarrollado (ver punto 8 anterior). Se ha establecido tanto el uso de un divisor de flujo como las condiciones de la fuente y los parámetros de transferencia para conseguir resultados lo más sensibles y precisos posibles. Se han establecido las condiciones de calibración y por último se ha usado para la separación de los ocho antibióticos llevando a cabo la identificación por masa exacta, tanto en modo positivo como negativo y las características analíticas del futuro método, demostrando la potencialidad de esta técnica como sistema de detección en HPLC.

Fe de erratas

-
- ⇒ Página 84, en el primer párrafo, línea 11: "...four phosphorimetric methods have been described" debe ser "three phosphorimetric methods...".
- ⇒ Página 84, Figura 1, la leyenda de las válvulas debe ser "LOAD" y "INJECT", en lugar de "LOA" e "INJEC".
- ⇒ Página 84, en el párrafo "Flow-through optosensor", "Na₂SO₄" debe ser "Na₂SO₃".
- ⇒ Página 89, en el "Abstract", "294/306 nm" debe ser "294/326 nm".
- ⇒ Página 91, en el pie de figura de la Figura 2, "290/328 nm" debe ser "294/326 nm".
- ⇒ Página 99, en la Tabla 5, las unidades del Límite de Detección son ng mL⁻¹.
- ⇒ Página 120, en la Figura 1, la fórmula del derivado anión-catión formado tras interactuar con el VOC está mal escrita, debe ser [AgL(etanol)_n][Au(C₆F₅)₂].
- ⇒ Página 122, la fórmula de la Absorbancia debe ser:

$$A = -\log\left(\frac{S_{\lambda} - D_{\lambda}}{R_{\lambda} - D_{\lambda}}\right)$$

