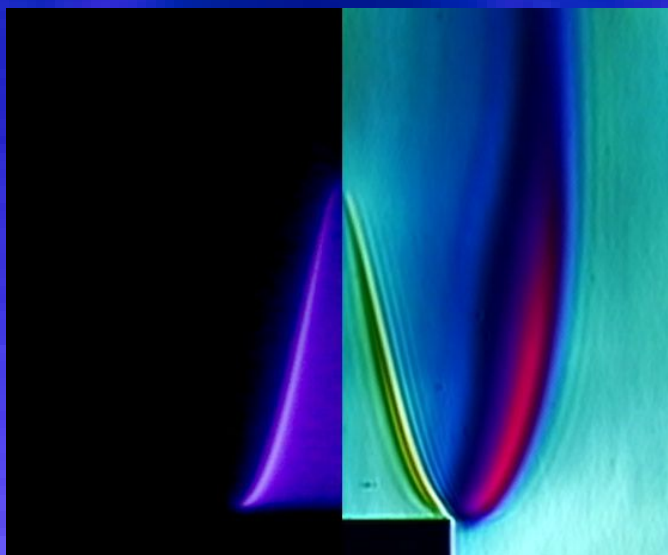


LA (ELECTRO)QUIMIOLUMINISCENCIA EN TÉCNICAS
RÁPIDAS DE ANÁLISIS:
(BIO)SENSORES ÓPTICOS Y
CROMATOGRAFÍA A BAJA PRESIÓN

Universidad de Granada



Julio Ballesta Claver

UNIVERSIDAD DE GRANADA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA



**LA (ELECTRO)QUIMIOLUMINISCENCIA EN
TÉCNICAS RÁPIDAS DE ANÁLISIS:
(BIO)SENSORES ÓPTICOS Y
CROMATOGRAFÍA A BAJA PRESIÓN**

TESIS DOCTORAL

JULIO BALLESTA CLAVER

GRANADA, 2009

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Julio Ballesta Claver
D.L.: GR. 2017-2009
ISBN: 978-84-692-1879-2

**LA (ELECTRO)QUIMIOLUMINISCENCIA EN
TÉCNICAS RÁPIDAS DE ANÁLISIS:
(BIO)SENSORES ÓPTICOS Y
CROMATOGRAFÍA A BAJA PRESIÓN**

por

Julio Ballesta Claver

Departamento de Química Analítica

Universidad de Granada

VISADO en Granada, a 20 de Febrero de 2009.

MEMORIA presentada para aspirar al Grado de Doctor en Ciencias Químicas. Granada, a 20 de Febrero de 2009.

Fdo.-
Prof. Dr. D. **Luis Fermín Capitán Vallvey**,
Catedrático del Departamento de Química
Analítica de la Universidad de Granada.

Fdo.- **Julio Ballesta Claver**, Licenciado
en Ciencias Químicas.

Prof. Dr. Dña. **M^a Carmen Valencia Mirón**,
Profesora Titular del Departamento de Química
Analítica.

A mi familia:
mi madre Julia, mi hermana Lucía, mi hermano Ginés
y a mi padre, llamado también Ginés, esperando
que pueda disfrutarlo desde lo alto.

AGRADECIMIENTOS

“Cuando bebas agua, recuerda la fuente”

Proverbio chino

“Solo un exceso es recomendable en el mundo: el exceso de gratitud”

Jean de la Bruyère (1645-1696)

Escritor Francés

AGRADECIMIENTOS

La verdad, ¿por donde empezar? Han sido tantas las experiencias vividas a lo largo de la realización de esta memoria que llegado el momento, sintetizar en breves palabras todo lo vivido, toda la gente que ha participado en ella, todo agradecimiento por mi parte conllevaría largas veladas de buenos momentos.

Empezaré mencionando a mis directores de Tesis: a Dña M^a del Carmen Valencia Mirón, profesora del Departamento de Química Analítica, que me abrió las puertas de la investigación y confió en mí desde el primer momento a la cual tengo mucho que agradecer ya que sin su apoyo esta Tesis no habría ni comenzado ni terminado, siendo además una gran persona. A D. Luis Fermín Capitán Vallvey, catedrático de Química Analítica, por ser un gran profesor, un buen investigador, un referente de la investigación y de la universidad, una persona de gran calidad humana tanto en el trato personal como en el profesional, por su

dedicación y esfuerzo y por estar, junto con M^a del Carmen Valencia, en los momentos en los cuales los he necesitado. A ambos gracias por todo.

Quiero dar las gracias al Departamento de Química Analítica, ya que durante todos estos años ha sido como mi segunda casa, sobre todo a los profesores que lo integran, los cuales me brindaron su apoyo cuando lo necesitaba. Sobre todo a D. José Luis Vilchez, Alberto Navalón Montón, Ignacio De Orbe Payá, M^a Dolores Fernández Ramos, Eloísa Manzano Moreno y M^a Gracia Bagur González por interesarse por mi trabajo y hacerme compañía durante el trayecto. También a D. Luis Cuadros Rodríguez por las charlas mantenidas en cuanto se me presentaba algún problema quimiométrico y en especial a Dña Ana María García Campaña, por su apoyo en cuantas cuestiones quimioluminiscentes se nos presentaban y por facilitarnos algún instrumental necesario para llevar a cabo la investigación, además de los momentos vividos en la asistencia a congresos. A los profesores Lilia Araújo y Avismelsi Prieto, los cuales conocí en mi primer año y me orientaron en lo que debe de ser una investigación, a los cuales desde aquí agradezco su ayuda.

A mis compañeros de laboratorio, que por los años mantenidos, que han sido nueve, he tenido la oportunidad de conocer a dos grandes grupos:

Mi grupo inicial: a Eduardo, por su compañía, a Clara, por los momentos difíciles, a Jalila, por su amabilidad, a Pedro, por ser un maestro, a Emilio, por ser un amigo, a Alejandro, por su ayuda, interés y por los buenos momentos, a Javier López, y en especial a tres grandes amigos: a Juan Francisco García Jiménez, por compartir momentos de diversión, momentos de reflexión y momentos importantes de su vida y por haber podido trabajar conjuntamente con el en la

realización del capítulo 2 de esta Memoria. A Miguel María Erenas Rodríguez, por amenizar las mañanas y las tardes de laboratorio con sus “*miguelismos*” además de los buenos momentos vividos, y en especial a Younes Taferssiti Zarouila, a quien considero como mi compañero de fatigas, por empezar la dura tarea de comprender (y de medir, que no era tarea fácil, sobre todo en ese cuarto oscuro...) la quimioluminiscencia, ¡ardua tarea amigo Sancho!, y además por compartir tantos momentos dentro y fuera del laboratorio, y sobre todo por su comprensión y compañía.

A José Fernando Huertas Pérez, el amigo de la puerta de al lado, persona trabajadora y como el dice muchas veces, un “compadre donde los haya”, por las charlas mantenidas a horas nocturnas en el Departamento, tanto científicas como humanas, cuando nada más que quedan unos cuantos que todavía trabajan (entre ellos Arnold Goffin) y gracias sobre todo por aquel día que me quede encerrado en el ascensor y por esos donuts que me trajiste cuando más falta me hacían.

A Joaquín Gómez Sánchez por su colaboración y compañía en la elaboración de esta Memoria, sobre todo en la realización del proyecto de investigación realizado en mi segundo año, por su buen hacer con la carpintería lo que condujo a que el capítulo 5 llegara a buen puerto y por supuesto por dejar subir, tanto en su moto como en su coche, las muestras de orina y suero a la Facultad de Farmacia, las que tanto hemos paseado, y sobre todo por compartir aquellos desayunos con suizo plancha incluidos.

A Inma, Carolina, Ana, Marcio, mis compañeros/as del otro lado, que siempre estaban dispuestos/as a ayudarme para cualquier cosa.

Mi grupo actual: a Olga Roldán, por su carácter tan alegre, por su simpatía y gratitud, una buena amiga; a Isabel, por su simpatía y sobre todo por ese disco de Mariah Carey que me faltaba; a María, Sonia y Estefanía, por su compañía y por aquel congreso de Huelva que pasamos tan bien; a Paulina, por sus sabios consejos, amabilidad y por echar un cable cuando hacía falta; a Carmen por su simpatía y don de gentes, y en general, a todas por estar ahí los días en los que más se necesita una inyección de optimismo.

A mi familia, sobre todo mis hermanos Lucía y Ginés, por sus sabios consejos y por estar siempre para lo que haga falta, y a mi madre Julia, ¿que se puede decir a una madre? Pues todo, y aún así me quedaría corto. Gracias por aguantar los días esos que llegas de madrugada (midiendo eh, midiendo..), los que llegas tarde al mediodía, los días interminables con las clases particulares que parecen nunca acabar, la escritura de la Tesis, que ha supuesto estar encerrado cual monje budista por una buena causa, ¡qué os voy a contar!

Para terminar me gustaría nuevamente agradecer a mis directores Dña M^a del Carmen Valencia Mirón y a D. Luis Fermín Capitán Vallvey por su dirección ya que sin su apoyo y buen hacer esta Memoria no hubiera sido posible, es decir, no hubiera llegado a ver la luz.

¡Gracias a todos!

Julio Ballesta Claver

Entonces Dios dijo: "Hágase la luz". Y la luz se hizo. Dios vio que la luz era buena, y separó la luz de las tinieblas.... este fue el primer día.

Génesis, Capítulo 1

"En resumen, la luz es la forma mas refinada de la materia"



*Louis de Broglie (1892-1987)
Premio Nobel de Física en 1929*

ÍNDICE

ÍNDICE

<i>AGRADECIMIENTOS</i>	9
<i>ÍNDICE</i>	19
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	53
1.1. Quimioluminiscencia y Electroquimioluminiscencia	53
1.1.1. Quimioluminiscencia	55
❖ <i>Fundamentos</i>	55
❖ <i>Principales reacciones en fase líquida</i>	59
❖ <i>Introducción de la muestra y reactivos</i>	60
❖ <i>Instrumentación</i>	62
❖ <i>Limitaciones y aplicaciones</i>	64
1.1.2. Electroquimioluminiscencia	65

❖	<i>Fundamentos</i>	65
❖	<i>Ventajas</i>	66
❖	<i>Mecanismos generales de EQL</i>	66
❖	<i>Principales reacciones</i>	68
❖	<i>Potencialidad EQL</i>	69
❖	<i>Limitaciones de EQL</i>	70
❖	<i>Instrumentación</i>	70
1.2.	Características del Análisis por Inyección en flujo (FIA)	74
1.2.1.	Componentes de un analizador FIA	76
❖	<i>Módulo de propulsión</i>	76
❖	<i>Sistema de inserción o inyección</i>	77
❖	<i>Sistema de transporte</i>	78
❖	<i>Sistema de reacción</i>	78
❖	<i>Sistema de Detección</i>	78
1.3.	Separaciones en analizadores FIA	79
1.4.	Sólidos monolíticos	81
1.4.1.	Columnas monolíticas: tipos y usos	83
1.4.2.	Monolitos de polímeros orgánicos	86
1.4.3.	Monolitos de polímeros inorgánicos	89
1.4.4.	Combinación de columnas monolíticas con sistemas de flujo	94
1.5.	Ensayos rápidos y sensores desechables	95

1.5.1.	Esquemas de sensado óptico	101
1.5.2.	Sensores desechables quimioluminiscentes	102
1.5.3.	Sistemas analíticos con sensores electroquimioluminiscentes de un solo uso	105
1.5.4.	Inmovilización de reactivos en sensores quimioluminiscentes y electroquimioluminiscentes	106
1.6.	Bibliografía	108

**CAPÍTULO 2: ANÁLISIS DE PARABENES EN COSMÉTICOS
MEDIANTE CROMATOGRFÍA LÍQUIDA A BAJA PRESIÓN CON
COLUMNA MONOLÍTICA Y DETECCIÓN QUIMIOLUMINISCENTE**

		125
2.1.	Introducción	125
2.2.	Experimental	128
2.2.1.	Productos químicos y materiales	128
2.2.2.	Instrumentación y programas informáticos	129
2.2.3.	Procedimiento	130
	❖ <i>Patrones y muestras</i>	130
	❖ <i>Referencia</i>	131
	❖ <i>Mantenimiento</i>	132
2.2.4.	Muestras	133
2.2.5.	Preparación de la muestras	133

2.3.	Resultados y discusión _____	134
2.3.1.	Procedimiento de separación _____	135
2.3.2.	Optimización de la detección QL _____	138
	❖ <i>Velocidad del flujo total</i> _____	138
	❖ <i>Concentración de H₂SO₄</i> _____	140
	❖ <i>Volumen del bucle</i> _____	141
	❖ <i>Concentración de Cerio(IV)</i> _____	142
	❖ <i>Concentración de Rodamina 6G</i> _____	145
	❖ <i>Fuerza iónica</i> _____	146
2.3.3.	Mecanismo de la Quimioluminiscencia _____	146
2.3.4.	Parámetros Analíticos _____	152
2.3.5.	Aplicaciones analíticas _____	154
2.4.	Conclusiones _____	158
2.5.	Bibliografía _____	158
CAPÍTULO 3: ANÁLISIS DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN DERMOCOSMÉTICOS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA A BAJA PRESIÓN Y DETECCIÓN QUIMIOLUMINISCENTE _____		167
3.1.	Introducción _____	167
3.2.	Experimental _____	171
3.2.1.	Productos químicos y materiales _____	171

3.2.2.	Instrumentación y programas informáticos _____	172
3.2.3.	Procedimiento _____	174
❖	<i>Patrones y muestras</i> _____	174
❖	<i>Referencia</i> _____	175
❖	<i>Mantenimiento</i> _____	175
3.2.4.	Muestras _____	176
3.2.5.	Preparación de las muestras _____	176
3.3.	Resultados y discusión _____	177
3.3.1.	Separación cromatográfica _____	178
❖	<i>Velocidad de flujo de la separación</i> _____	182
❖	<i>Condiciones de la separación</i> _____	183
3.3.2.	Detección quimioluminiscente _____	184
❖	<i>Velocidad total de flujo</i> _____	185
❖	<i>Concentración de Ce(IV)</i> _____	185
❖	<i>Concentración de H₂SO₄</i> _____	187
❖	<i>Concentración de Rodamina 6G</i> _____	189
❖	<i>Volumen del bucle</i> _____	190
❖	<i>Fuerza iónica</i> _____	191
3.3.3.	Mecanismo de emisión quimioluminiscente _____	192
3.3.4.	Parámetros analíticos _____	195
3.3.5.	Aplicaciones analíticas _____	198
3.4.	Conclusión _____	200

3.5.	Bibliografía _____	201
------	--------------------	------------

CAPÍTULO 4: DETERMINACIÓN DE HIPOCLORITO EN AGUAS UTILIZANDO UN SENSOR QUIMIOLUMINISCENTE DE UN SOLO USO _____	211
---	------------

4.1.	Introducción _____	211
------	--------------------	------------

4.2.	Experimental _____	215
------	--------------------	------------

4.2.1.	Productos químicos y materiales _____	215
--------	---------------------------------------	------------

4.2.2.	Instrumentación y programas informáticos _____	216
--------	--	------------

4.2.3.	Preparación de la membrana _____	218
--------	----------------------------------	------------

4.2.4.	Medidas de quimioluminiscencia _____	220
--------	--------------------------------------	------------

4.2.5.	Procedimiento _____	220
--------	---------------------	------------

❖	<i>Patrones y muestras</i> _____	220
---	----------------------------------	------------

4.3.	Resultados y discusión _____	220
------	------------------------------	------------

4.3.1.	Selección de reactivos y soporte sólido _____	220
--------	---	------------

4.3.2.	Reacción quimioluminiscente en fase sólida _____	223
--------	--	------------

4.3.3.	Optimización del sensor de un solo uso _____	228
--------	--	------------

4.3.4.	Parámetros analíticos _____	236
--------	-----------------------------	------------

4.3.5.	Aplicación del sensor de un solo uso para hipoclorito ____	238
--------	--	------------

4.4. Conclusiones _____ **239**

4.5. Bibliografía _____ **240**

**CAPÍTULO 5: BIOSENSOR QUIMIOLUMINISCENTE DE UN SOLO
USO PARA LACTATO** _____ **247**

5.1. Introducción _____ **247**

5.2. Experimental _____ **251**

5.2.1. Productos químicos _____ **251**

❖ *Preparación de la enzimas* _____ **252**

5.2.2. Instrumentación y programas informáticos _____ **252**

5.2.3. Preparación de la membrana y los biosensores _____ **254**

5.2.4. Procedimiento _____ **256**

❖ *Patrones y muestras* _____ **256**

❖ *Referencia* _____ **256**

5.2.5. Tratamiento de las muestras de yogur _____ **257**

5.3. Resultados y discusión _____ **257**

5.3.1. Inmovilización de los reactivos de la química de
reconocimiento _____ **257**

5.3.2.	Optimización de la composición del biosensor para lactato	259
	❖ <i>Composición de la capa formada por el complejo poliiónico</i>	260
	❖ <i>Influencia de LOx y ARP</i>	263
	❖ <i>Dependencia del luminol</i>	264
	❖ <i>La función del aluminio</i>	265
	❖ Preparación del biosensor	267
5.3.3.	Optimización de las condiciones experimentales.	268
5.3.4.	Características de la señal quimioluminiscente	271
5.3.5.	Mecanismo Quimioluminiscente	272
5.3.6.	Parámetros analíticos	276
5.3.7.	Aplicaciones	281
5.4.	Conclusiones	282
5.5.	Bibliografía	283
CAPÍTULO 6: DESARROLLO DE UN BIOSENSOR ELECTROQUIMIOLUMINISCENTE DESECHABLE PARA LA DETERMINACIÓN DE LACTATO EN SALIVA		
		291
6.1.	Introducción	291
6.2.	Experimental	295
6.2.1.	Productos químicos y materiales	295

❖	<i>Preparación de la enzima</i>	296
❖	<i>Preparación de saliva artificial</i>	296
6.2.2.	Instrumentación y programas informáticos	296
6.2.3.	Celdas electroquímicas serigrafiadas	298
6.2.4.	Preparación del biosensor desechable	299
6.2.5.	Procedimientos	300
❖	<i>Patrones</i>	300
❖	<i>Saliva</i>	301
❖	<i>Método de referencia</i>	301
6.2.6.	Tratamiento de las muestras de saliva	302
6.3.	Resultados y discusión	302
6.3.1.	Inmovilización de los reactivos para la determinación de lactato	302
6.3.2.	Optimización de la composición del biosensor para lactato	305
❖	<i>Composición de la capa</i>	305
❖	<i>Volumen del cóctel</i>	309
6.3.3.	Condiciones electroquimioluminiscentes	309
❖	<i>Selección del voltaje</i>	309
❖	<i>Señal EQL</i>	311
❖	<i>Parámetros electroquímicos</i>	313
6.3.4.	Optimización de las condiciones experimentales	313
❖	<i>Influencia del pH</i>	313

❖	<i>Disolución amortiguadora y contribución del electrolito</i>	
	315	
❖	<i>Volumen de muestra</i> _____	316
❖	<i>Temperatura</i> _____	316
6.3.5.	Mecanismo EQL _____	317
6.3.6.	Parámetros analíticos _____	319
6.3.7.	Aplicaciones _____	324
6.4.	Conclusiones _____	329
6.5.	Bibliografía _____	330
	<i>PROYECTOS FUTUROS</i> _____	337
	<i>CONCLUSIONES</i> _____	343
	<i>ANEXO I: PUBLICACIONES</i> _____	351

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Clasificación de las reacciones quimioluminiscentes.....	56
Figura 1.2 Formas de medir la señal analítica: (a) la altura máxima del pico; (b) la señal a un tiempo fijado; (c) la integral de la señal en un determinado periodo tiempo; (d) la integral del pico completo.....	59
Figura 1.3 Instrumentación y componentes esenciales para la medida de la QL y BL: (a) Luminómetro; (b) Cámara CCD; (c) Fotodiodo; (d) Fotomultiplicador.....	64
Figura 1.4 Mecanismo de aniquilación EQL.....	67
Figura 1.5 Mecanismo EQL con correactante (C).....	68
Figura 1.6 Instrumentación electroquímica para la producción EQL: potencióstato de sobremesa (a) ó portátil (b) y electrodos (c).....	71
Figura 1.7 Celda de flujo para determinaciones electroquímicas con electrodos serigrafados de Dropsens.....	73
Figura 1.8 Bomba peristáltica Gilson Minipuls-3.....	77
Figura 1.9 Imagen de la estructura porosa bimodal de los sólidos monolíticos.....	82
Figura 1.10 Número de publicaciones acerca de columnas monolíticas en cromatografía por año hasta fin de 2008. Se ha obtenido buscando “monolithic column chromatography” en SciFinder Scholar, versión 2006, ACS.....	83

Figura 1.11 Esquema para la preparación de un monolito orgánico para CEC [56].	87
Figura 1.12 Formación de los monolitos vía (a) policondensación (Minakuchi) y (b) silicato (Fields).....	93
Figura 2.1 Estructura molecular de los cuatro parabenos ensayados en este capítulo: metilparaben (MP), etilparaben (EP), propilparaben (PP), y butilparaben (BP).	127
Figura 2.2 Configuración del sistema de flujo con minicolumna y detección QL.	132
Figura 2.3 Representación de los resultados mediante diagramas de barras.	136
Figura 2.4 (a) Dependencia del porcentaje de ACN con respecto al tiempo de retención para los diferentes parabenos (cada valor es la media de tres medidas). Condiciones: portador: ACN/agua. Patrones $12,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$; velocidad de flujo: $1,4 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$; volumen del bucle: $150 \mu\text{l}$. (b) Dependencia de la composición del portador B con el tiempo de retención. Condiciones: Portador A: 12 % ACN/agua, portador B: ACN/agua. Velocidad de flujo: $2,6 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$; Patrones, $12,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$; volumen del bucle: $150 \mu\text{l}$. Las barras representan el tiempo de retención de los parabenos y las líneas horizontales (barras de error) son la anchura de los picos.	137
Figura 2.5 Variación de la señal QL con el flujo. Condiciones: $\text{Ce(IV)} 10^{-2} \text{ M}$; $\text{Ro } 6\text{G } 10^{-4} \text{ M}$; patrones $2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (♦ MP, ■ EP, ▲ PP, ● BP). El eje x muestra el flujo total compuesto por las dos bombas peristálticas del sistema.	139
Figura 2.6 Variación de la señal QL con respecto a la concentración de H_2SO_4 . Condiciones: $\text{Ce(IV)} 10^{-2} \text{ M}$; $\text{Ro } 6\text{G } 10^{-4} \text{ M}$; volumen del bucle: $50 \mu\text{l}$; patrones $2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (♦ MP, ■ EP, ▲ PP, ● BP). Las barras verticales representan la repetibilidad para cada señal QL (tres réplicas por punto).	140
Figura 2.7 Variación de la señal QL con respecto al volumen del bucle utilizado. Condiciones: $\text{Ce(IV)} 10^{-2} \text{ M}$; $\text{Ro } 6\text{G } 10^{-4} \text{ M}$; $\text{H}_2\text{SO}_4 2 \text{ M}$; patrones $2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (♦ MP, ■ EP, ▲ PP, ● BP).	142
Figura 2.8 Variación de la señal QL con respecto a la concentración de Ce(IV) . Condiciones: $\text{Ro } 6\text{G } 10^{-4} \text{ M}$; $\text{H}_2\text{SO}_4 2 \text{ M}$; volumen bucle $75 \mu\text{l}$; patrones $2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (♦ MP, ■ EP, ▲ PP, ● BP).	143
Figura 2.9 Sistema FIA utilizado para justificar el efecto de la concentración de Ce(IV)	144
Figura 2.10 Efecto de la longitud B de la configuración FIA de la Figura 2.9. Condiciones: $\text{Ro } 6\text{G } 4\cdot 10^{-4} \text{ M}$; $\text{H}_2\text{SO}_4 2 \text{ M}$; $\text{Ce(IV)} 2\cdot 10^{-2} \text{ M}$; volumen del bucle $75 \mu\text{l}$; patrón MP $2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ y velocidad de flujo $2,5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$	144

Figura 2.11 Variación de la señal QL con respecto a la concentración de Ro 6G. Condiciones: Ce(IV) $2 \cdot 10^{-2}$ M; H ₂ SO ₄ 2 M; volumen bucle: 75 μ l; patrones $2 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ (♦ MP, ■ EP, ▲ PP, ● BP).....	145
Figura 2.12 Mecanismo de la hidrólisis ácida de los parabenos [41].....	148
Figura 2.13 Registro de los 4 parabenos ($1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) inyectados por separado. Condiciones: $2 \cdot 10^{-2}$ M Ce(IV); $4 \cdot 10^{-4}$ Ro 6G; H ₂ SO ₄ 2 M; volumen bucle: 75 μ l; velocidad de flujo $2,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$	149
Figura 2.14 Sistema FIA utilizado para explicar el mecanismo de reacción.	150
Figura 2.15 Experimento destinado a explicar la simultaneidad de las reacciones a partir de la configuración FIA de la Figura 5.14. Condiciones: $4 \cdot 10^{-4}$ M Ro 6G; H ₂ SO ₄ 2 M; $2 \cdot 10^{-2}$ M Ce(IV); volumen del bucle 75 μ l; patron MP $2 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ y velocidad de flujo $2,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$	151
Figura 2.16 Calibración lineal a partir de los 8 patrones de los 4 parabenos (♦ MP, ■ EP, ▲ PP, ● BP).....	153
Figura 2.17 Registro de los patrones y de las distintas muestras (crema limpiadora y toallitas).	157
Figura 3.1 Estructura de los diferentes compuestos fenólicos ensayados.	170
Figura 3.2 Configuración del sistema de flujo con minicolumna y detección QL.....	173
Figura 3.3 Representación de la separación de compuestos fenólicos mediante un diagrama de barras.....	179
Figura 3.4 Dependencia del tiempo de retención respecto al pH. Todos los puntos son el promedio de tres réplicas. Las barras representan el tiempo de retención de cada compuesto fenólico y las barras de error la anchura del pico. Condiciones: $5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ para cada CFs. Velocidad de flujo: $1,2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Volumen del bucle: 75 μ l.	180
Figura 3.5 Dependencia del tiempo de retención respecto al % de ACN.	181
Figura 3.6 Variación del tiempo de retención con respecto a la velocidad de flujo. Condiciones: patrones: $5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$; volumen del bucle: 75 μ l.	182
Figura 3.7 Registro de la separación con detección QL.....	183
Figura 3.8 Optimización de la concentración de Ce(IV) (♦ PH, ■ DHBA, ▲ SA, □ MP, ● PG) utilizando $5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ para PH, SA y PG y $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ para DHBA y MP.....	186
Figura 3.9 Optimización de la concentración de H ₂ SO ₄ , obtenidas usando Ro 6G 10^{-4} M, 75 μ l de volumen de bucle y manteniendo constante las concentraciones óptimas de Ce(IV), (♦ PH, ■ DHBA, ▲ SA, □ MP, ● PG).	187

Figura 3.10 Optimización de la concentración de Ro 6G, obtenidas a partir 75 μ l de volumen de bucle y manteniendo constante las concentraciones óptimas de Ce(IV) y H ₂ SO ₄ (♦ PH, ■ DHBA, ▲ SA, □ MP, ● PG).....	188
Figura 3.11 Registro de la influencia del aumento del volumen del bucle.....	191
Figura 3.12 Optimización del volumen del bucle (♦ PH, ■ DHBA, ▲ SA, □ MP, ● PG).	192
Figura 3.13 Hidrólisis de MP y PG.....	193
Figura 3.14 Representación gráfica de patrones para los distintos compuestos fenólicos (♦ PH, ■ DHBA, ▲ SA, □ MP, ● PG).	196
Figura 3.15 Calibrado linealizado de los compuestos fenólicos	196
Figura 3.16 Separación obtenida para el gel limpiador y la crema correctora.	199
Figura 4.1 Ejemplos de sensores comerciales de un solo uso: a) identificación de cafeína en líquidos; b) análisis de orina; c) análisis de aguas (Aquacheck®).	211
Figura 4.2 Dispositivo utilizado para la medida de los sensores quimioluminiscentes de un solo uso.	218
Figura 4.3 Esquema para la preparación de los sensores de un solo uso para la determinación de hipoclorito.....	219
Figura 4.4 Preparación de sensores de un solo uso QL en papel aniónico DE-81.	219
Figura 4.5 Colorantes xanténicos utilizados: uranina, rodamina 6G y pironina Y.....	221
Figura 4.6 Dispositivo de giro para la preparación de membranas circulares.....	222
Figura 4.7 Espectros de fluorescencia (a) y quimioluminiscencia (b) del sensor de un solo uso conteniendo fluoresceinato sódico.....	224
Figura 4.8 Fórmulas moleculares de la fluoresceína en estado sólido y en disolución, obtenido de [17].	225
Figura 4.9 Formación de oxígeno singlete.	226
Figura 4.10 Generación de QL sensibilizada por la uranina.	227
Figura 4.11 Influencia de la concentración de fluoresceinato en la tira reactiva.....	229
Figura 4.12 Dependencia del pH en el sensor de un solo uso.	230
Figura 4.13 Influencia de la fuerza iónica sobre el sensor de un solo uso para una concentración de ClO ⁻ de 3·10 ⁻⁴ M.	232
Figura 4.14 Cubetas utilizadas para la influencia del volumen de muestra.....	232

Figura 4.15 Dispositivo neumático para la introducción de la muestra.	233
Figura 4.16 Señales de quimioluminiscencia replicadas a partir de un mismo sensor.	235
Figura 4.17 Señales QL para diferentes concentraciones de hipoclorito.	236
Figura 5.1 Ácido L(+)-láctico.	247
Figura 5.2 Determinación de lactato en sangre mediante el sistema Lactate Scout®;.	248
Figura 5.3 Configuración del dispositivo para la determinación de lactato.	253
Figura 5.4 Preparación de la tira reactiva con el dispositivo giratorio.	255
Figura 5.5 Biosensores de un solo uso para la determinación de lactato.	256
Figura 5.6 Ilustración esquemática de: (a) una mezcla del polication (PLL) y la enzima lactato oxidasa (LOx) y (b) la membrana final obtenida por la adición del polianión (PSS) a la mezcla. Diagrama realizado a partir de Mizutani y col. [33].	258
Figura 5.7 Representación de la actividad enzimática de las enzimas LOx (♦) y ARP (▲) respecto al pH. Figura compuesta a partir de los datos suministrados por Kim y col. [37] y Gu y col. [38].	260
Figura 5.8 Membranas de lactato formadas con PLL y PSS.	261
Figura 5.9 Influencia de la relación PLL/PSS sobre la QL generada (5 réplicas por punto utilizando un nuevo sensor en cada medida).	262
Figura 5.10 Influencia de la concentración de PLL manteniendo constante la relación PLL/PSS en 0,1.	263
Figura 5.11 Efecto de la contribución enzimática a la señal QL relativa. Leyenda: ♦ para LOx y ■ para ARP.	264
Figura 5.12 Optimización de la concentración de luminol en la membrana.	265
Figura 5.13 Optimización de la concentración de Al en la membrana.	266
Figura 5.14 Efecto de la concentración de aluminio en la membrana sobre la emisión QL a pH 8,8. a) $1,2 \cdot 10^{-4}$ M Al; b) 10^{-3} M Al; c) 10^{-2} M Al; d) 10^{-1} M Al; e) membrana preparada en un soporte de Al. Obsérvese el cambio de comportamiento de las curvas “a” hasta “e”.	267
Figura 5.15 Optimización del volumen de cóctel depositado.	268
Figura 5.16 Optimización del pH. a) Variación de QL con el pH; b) Variación de la relación señal/ruido con el pH.	269

Figura 5.17 Registros QL para el biosensor de lactato correspondientes a una señal de blanco (a) y una señal de lactato (b).....	271
Figura 5.18 Reacción de reconocimiento de lactato.....	272
Figura 5.19 Reacción quimioluminiscente del luminol con H ₂ O ₂	273
Figura 5.20 Reacción quimioluminiscente del luminol con H ₂ O ₂ mediante catálisis de la peroxidasa ARP.	274
Figura 5.21 Reacción radicalaria del luminol con peróxido de hidrógeno.....	274
Figura 5.22 Efecto de la composición de la membrana en la emisión QL; a) membrana de Al con luminol añadiendo tampón; b) membrana de Al y luminol añadiendo lactato; c) membrana de ARP y luminol añadiendo tampón; d) membrana de ARP y luminol añadiendo lactato; e) membrana de ARP, luminol y Al añadiendo tampón; f) membrana de ARP, luminol y Al añadiendo lactato. Todas las membranas incluyen 710 IU·l ⁻¹ de LOx. En todos los casos las concentraciones fueron: Al 1,2·10 ⁻⁴ M; ARP 15.500 IU·l ⁻¹ ; luminol 10 ⁻³ M y lactato 6·10 ⁻⁴ M.	275
Figura 5.23 Calibración del biosensor para lactato. Las curvas indican: a) blanco; b) 2·10 ⁻⁴ M; c) 6·10 ⁻⁴ M; d) 8·10 ⁻⁴ M; e) 10 ⁻³ M; f) 2·10 ⁻³ M de lactato. La recta g indica la linealización obtenida a los 2 minutos y la recta h a los 30 segundos.....	277
Figura 5.24 Tiempo de vida para el biosensor de lactato.	279
Figura 6.1 Ácido L(+)-láctico.	292
Figura 6.2 Detectores amperométricos portátiles de lactato para fitness.	293
Figura 6.3 Configuración de la disposición instrumental empleada para la determinación de lactato.	297
Figura 6.4 Celda serigrafiada con el receptáculo dispuesto sobre ella y los distintos electrodos.	299
Figura 6.5 Preparación de Biosensores ECL de un solo uso para la determinación de lactato.....	300
Figura 6.6 Deposición de la muestra en la celda electroquímica.	301
Figura 6.7 Configuración bicapa para el biosensor de lactato.....	304
Figura 6.8 Configuración monocapa para el biosensor de lactato.....	304
Figura 6.9 Optimización de Methocel. La señal EQL incrementa hasta alcanzar un máximo a 49,9 mg·ml ⁻¹	306

Figura 6.10 Optimización de la concentración de LOx. El máximo se produce a 12,5 IU·ml ⁻¹	307
Figura 6.11 Optimización de BSA para formar la membrana. El máximo se produce a 100 g·l ⁻¹	308
Figura 6.12 Optimización de luminol en membrana.....	309
Figura 6.13 Voltamograma cíclico del luminol a 10 ⁻³ M de concentración.....	310
Figura 6.14 Dependencia de la señal EQL con el voltaje aplicado aplicando pulsos de 1 s para cada voltaje.....	311
Figura 6.15 Conjunto de pulsos consecutivos de 1 s a 0,5 V aplicados cada 10 segundos. El recuadro de la derecha muestra una ampliación de los dos primeros pulsos, los cuales serán los que se utilizarán como señal analítica. Las condiciones experimentales fueron 0,2 M de tampón fosfato a pH 9,0 con 0,25 M de NaCl y 2·10 ⁻³ M de luminol a una concentración de 10 ⁻⁴ M de lactato.....	312
Figura 6.16 Optimización del pH para el biosensor de lactato. (a) En esta figura se muestra un máximo a pH 10,5 trabajando a concentración constante de lactato (10 ⁻⁴ M) aunque la repetibilidad disminuye cuando el pH aumenta ya que la señal del blanco se incrementa. (b) La relación S/R presenta un máximo a pH 9,0, siendo éste el escogido.....	314
Figura 6.17 Optimización de NaCl en la membrana.....	316
Figura 6.18 Efecto de la temperatura sobre el biosensor EQL de lactato.....	317
Figura 6.19 Reacción de reconocimiento de lactato.....	318
Figura 6.20 Mecanismo de la EQL de luminol con peróxido de hidrógeno.....	319
Figura 6.21 Representación gráfica de patrones de lactato presentando comportamiento logarítmico.....	320
Figura 6.22 Calibración log-log para lactato utilizando 5 réplicas por concentración.....	320
Figura 6.23 Diagrama de Shewhart del tiempo de vida del biosensor desechable de lactato.....	322
Figura 6.24 Representación del calibrado (◆) y la adición de patrón (■).....	324
Figura 6.25 Voltamograma de una disolución de ácido ascórbico (10 ⁻³ M) y ácido úrico (5·10 ⁻³ M) en tampón fosfato 0,2 M a pH 9,0 y 0,25 M de NaCl.....	326
Figura 6.26 Efecto de la concentración del ácido úrico en la curva de calibración de lactato con: (a) no adición; (b) 2·10 ⁻⁴ M y (c) 5·10 ⁻³ M.....	328

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Sistemas más comunes quimioluminiscentes.....	60
Tabla 1.2 Principales reacciones EQL.....	69
Tabla 2.1 Incremento producido (%) sobre los parámetros cromatográficos al aumentar el volumen del bucle de 20 a 150 μ l.....	141
Tabla 2.2 Parámetros analíticos para la determinación de MP, EP, PP y BP.....	154
Tabla 2.3 Comparación de la determinación de una mezcla de parabenos en muestras con diferentes técnicas analíticas.....	155
Tabla 2.4 Resultados del estudio de recuperación para una mezcla de parabenos en cosméticos.....	156
Tabla 2.5 Resultados obtenidos de una mezcla de parabenos en el método propuesto y en el de referencia.....	157
Tabla 3.1 Respuesta QL (%) para las diferentes reacciones con CFs.....	185
Tabla 3.2 Condiciones óptimas y de compromiso de los diferentes CFs.....	190
Tabla 3.3 Parámetros analíticos del método para la mezcla de compuestos fenólicos.....	197
Tabla 3.4 Resultados obtenidos por el método propuesto y el de referencia en muestras reales.....	200
Tabla 4.1 Parámetros analíticos para la determinación de hipoclorito.....	237

Tabla 4.2 Estudio de recuperación en aguas de distinta mineralización y procedencia.	239
Tabla 4.3 Determinación de hipoclorito en aguas mediante el método propuesto y el de referencia.....	239
Tabla 5.1 Parámetros analíticos para el biosensor de lactato.	278
Tabla 5.2 Comparación de las características de biosensores de lactato.	280
Tabla 5.3 Determinación de lactato en yogur.....	282
Tabla 6.1 Parámetros analíticos del biosensor EQL para lactato.	321
Tabla 6.2 Comparación de las características de diferentes biosensores para lactato. .	323
Tabla 6.3 Contribución de los diferentes componentes de la saliva artificial en la señal EQL.....	326
Tabla 6.4 Determinación de lactato en saliva por el método propuesto y el de referencia.	329

OBJETIVOS

“Para hacer una tarta de manzana, primero tienes que crear un Universo”



*Carl Edward Sagan (1934-1996)
Astrónomo, ganador de un Pulitzer y medalla de la NASA*

OBJETIVOS DE LA TESIS

El objetivo general que se pretende en esta Tesis Doctoral es el empleo de la quimioluminiscencia y electroquimioluminiscencia por las ventajas que presenta en cuanto a facilidad de utilización, portabilidad, versatilidad, sensibilidad y bajo coste, para la puesta a punto de métodos rápidos de análisis químico, empleando la metodología de análisis por inyección en flujo (FIA) para desarrollar una cromatografía a baja presión y de sensores ópticos de un solo uso.

Además se ha aplicado a la determinación de analitos en diversas matrices, tanto en cosmética, control medioambiental o diagnóstico clínico, metodologías que conllevan un aumento de la selectividad tales como separaciones a baja presión o con reacciones selectivas desarrollando sensores de un solo uso que permiten la determinación cuantitativa.

Por lo tanto, los objetivos específicos planteados en esta Memoria son:

1. Desarrollar nuevos métodos de análisis por inyección en flujo (FIA) con detección quimioluminiscente para la determinación rápida y selectiva de mezclas de analitos mediante el estudio de las posibilidades que ofrece el uso de columnas monolíticas como elemento separativo.
2. Determinar los conservantes metilparaben, etilparaben, propilparaben y butilparaben en cosméticos, por métodos FIA quimioluminiscentes con separación previa mediante columnas monolíticas.
3. Poner a punto un método FIA con detección quimioluminiscente y separación previa con columnas monolíticas para la determinación conjunta de floroglucinol, ácido 2,4-dihidroxibenzóico, ácido salicílico, metilparaben y n-propil galato en dermocosméticos.
4. Establecer las condiciones separativas óptimas en conjunción con las medidas quimioluminiscentes para conseguir la mejor composición de la disolución portadora y optimizar las condiciones de elución y detección para los diferentes analitos.
5. Caracterizar analíticamente los diferentes métodos desarrollados y demostrar su utilidad para el análisis de muestras reales, así como validar los resultados con métodos de referencia.
6. Contribuir al desarrollo de la portabilidad del análisis químico desarrollando metodologías analíticas para la determinación de analitos *in situ*. En concreto, mediante sensores de un solo uso de tipo óptico basados en la medida de quimioluminiscencia ó electroquimioluminiscencia.

-
7. Elegir el soporte, la membrana, los sistemas de inmovilización de reactivos y enzimas para diseñar el formato óptimo para cada sensor.
 8. Adquirir habilidades técnicas necesarias para la construcción, caracterización, desarrollo y conservación de sensores de un solo uso en las determinaciones químico y electroquimioluminiscentes.
 9. Desarrollar y caracterizar un sensor quimioluminiscente de un solo uso para la determinación de hipoclorito en aguas.
 10. Desarrollar un biosensor quimioluminiscente de un solo uso para la determinación de lactato en el campo alimentario.
 11. Desarrollar y caracterizar un biosensor electroquimioluminiscente de un solo uso para la determinación de lactato en el campo clínico como herramienta rápida de análisis cuantitativo.

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN

“La mejor forma de tener una buena idea es tener un montón de ideas”



*Linus Carl Pauling (1901-1994)
Premio Nobel de Química en 1954*

“Si tengo mil ideas y solo una termina por funcionar, me siento satisfecho”



*Alfred Nobel (1833-1896)
Químico sueco fundador de los premios Nobel*

“El valor de una idea reside en el uso que se le puede dar”



*Thomas Alva Edison (1847-1931)
Inventor estadounidense*

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

La obtención de información de calidad del problema bajo estudio de forma que presente la mínima incertidumbre (máxima veracidad) y la simplificación del procedimiento analítico robusteciéndolo de forma que sea cada vez más independiente de la habilidad del operador, son algunas de las tendencias actuales de la Química Analítica.

En esta Memoria de Doctorado nos hemos centrado en el uso de una propiedad de la materia como es la quimioluminiscencia y en su aplicación al análisis químico en dos vertientes diferentes que tienen de común la puesta a punto de metodologías de trabajo simples y de bajo costo. Por una parte, el desarrollo de métodos cromatográficos de baja presión basados en mini-columnas monolíticas y esquemas tipo FIA con detección quimioluminiscente lo que conducirá a métodos con buena capacidad de separación y sensibilidad para cada componente. Por otra parte, se estudiará la posibilidad de emplear medidas de quimioluminiscencia para la transducción en sensores desechables, tratando de salvar las dificultades que supone la inmovilización de reactivos y la medida de la señal cinética que se genera tras la reacción con el problema. A continuación, se desarrollarán de forma sucinta algunos aspectos sobre los que se trabaja en esta Memoria de Doctorado con objeto de situar el estado del arte.

1.1. Quimioluminiscencia y Electroquimioluminiscencia

Es especialmente interesante dentro de las técnicas ópticas el empleo de la luminiscencia, la cual se refiere a la emisión de radiación (Vis/IR) que ocurre

cuando una molécula en estado excitado se relaja radiativamente a su estado fundamental (Vis/IR). La producción de ese estado excitado a partir de distintas reacciones químicas origina la llamada quimioluminiscencia (QL), siendo denominada bioluminiscencia (BL) cuando esta emisión de luz se debe a reacciones químicas que tienen lugar en organismos vivos. Si esa reacción, que posteriormente genera emisión, se inicia electroquímicamente se le denomina electroquimioluminiscencia o luminiscencia electrogenerada (EQL). Esta conversión de energía eléctrica en energía radiante, supone la producción de compuestos intermedios reactivos, a partir de precursores estables en la superficie del electrodo, los cuales reaccionan y posteriormente emiten radiación [1].

La fracción de moléculas que emiten un fotón al retornar al estado excitado es el rendimiento cuántico (ϕ_{QL}) y es el producto de tres parámetros [2]:

$$\phi_{QL} = \phi_c \times \phi_e \times \phi_f \quad (\text{ec. 1})$$

donde ϕ_c es la fracción de moléculas que reaccionan que pueden originar moléculas excitadas y contribuir en al rendimiento de la reacción química; ϕ_e es la fracción de tales moléculas en un nivel electrónico excitado y relacionadas a la eficiencia de la transferencia de energía y ϕ_f es la fracción de estas moléculas excitadas que vuelven al estado fundamental emitiendo un fotón. Una gran cantidad de moléculas orgánicas son quimiolumigénicas pero los rendimientos cuánticos son generalmente muy bajos, normalmente menor del 1%. Esta ineficiencia, en la mayoría de los casos, es debida al bajo rendimiento de la reacción química o a la pobre transferencia de energía, pero, en algunos casos, la molécula

la excitada es un mal emisor. El rango de valores que toma el término ϕ_{QL} oscila entre 0,001 y 0,1. Por el contrario, se observan altas eficiencias cuánticas en bioluminiscencia. Por ejemplo, la reacción que tiene lugar en las luciérnagas *Photinus pyralis* tiene un ϕ_{QL} de 1.

1.1.1. Quimioluminiscencia

❖ *Fundamentos*

Existen dos tipos de reacciones QL:

1) la **directa** en la que la reacción genera directamente el estado electrónicamente excitado responsable de la emisión de luz. En ella, el producto excitado (C^*) de una reacción química exergónica ($A + B$) se relaja a su estado fundamental con emisión de fotones. En QL, la producción de luz se realiza por especies que sufren reacciones de transferencia de electrones altamente energéticas. Si el producto en un estado electrónico excitado consigue no perder toda su energía por procesos no radiativos (otras reacciones químicas, desactivación colisional, conversión interna, cruzamiento entre sistemas), se relajará emitiendo fotones de acuerdo con su rendimiento cuántico.

2) la **indirecta o sensibilizada** que ocurre cuando el producto excitado no es el responsable de la emisión de luz, sino que transfiere su energía al aceptor fluorescente (fluoróforo) que finalmente es el que emite luz y determina el espectro de emisión (Figura 1.1). La QL sensibilizada tiene ventajas sobre la directa, por ejemplo en el diseño de sistemas analíticos que permitan incorporar determinadas características estructurales que puedan ser incorporadas a los reactivos y/o

al fluoróforo. Así, el sistema fluoróforo es seleccionado para conseguir un compromiso óptimo entre longitudes de excitación y emisión, estabilidad química y rendimiento cuántico; mientras que en la QL directa la reactividad y las propiedades fluorescentes tienen que residir en una única molécula.

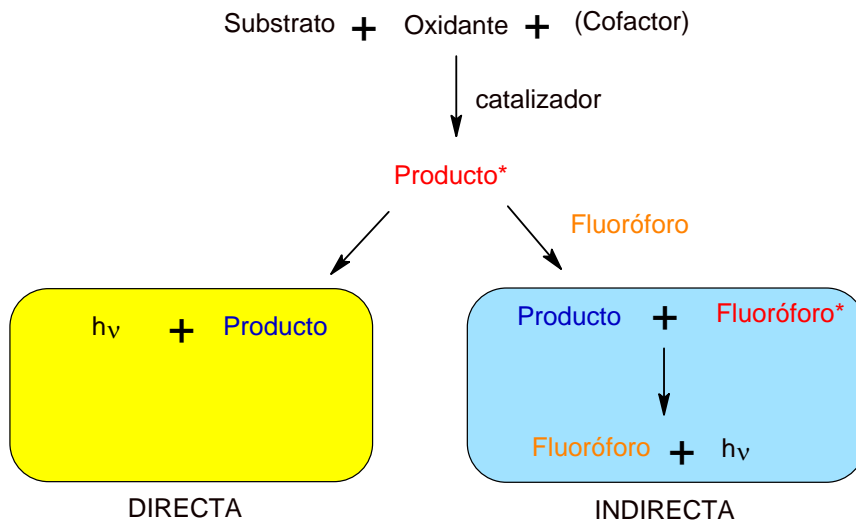


Figura 1.1 Clasificación de las reacciones quimioluminiscentes.

Para que se origine emisión QL deben reunirse 3 características esenciales:

- ❖ La reacción debe ser exotérmica para generar un estado excitado que emita en región VIS-IR cercano, requiriéndose para ello una energía mínima de 180 kJ/mol, siendo 300 kJ/mol para la emisión de luz azul y 180 kJ/mol para emisión de luz roja.

- ❖ El camino para la formación del estado excitado debe estar favorecido frente a otros procesos.
- ❖ La emisión de fotones debe ser el proceso de desactivación más favorable en relación a otros procesos no radiativos. En las reacciones de QL sensibilizada, tanto la eficiencia del proceso de transferencia de energía del estado excitado al fluoróforo como la eficiencia del proceso fluorescente, ambas, deben ser altas para la producción de la reacción quimioluminiscente.

Las medidas de QL resultan fuertemente dependientes de las condiciones experimentales, que afectan al rendimiento cuántico y a la velocidad de reacción, tales como:

- a) La estructura química del precursor quimioluminiscente, no solo la zona involucrada en la producción del estado excitado sino toda la estructura.
- b) La naturaleza y concentración de otros substratos que pueden favorecer procesos competitivos no radiativos.
- c) El tipo de catalizador seleccionado.
- d) La presencia de iones metálicos de transición.
- e) La temperatura, el pH y la fuerza iónica.
- f) La hidrofobicidad del disolvente y la composición de la disolución; como ejemplo se puede observar que el rendimiento cuántico del luminol en dimetilsulfóxido es de 0,05 mientras que en agua es 0,01, al mismo tiempo que el color pasa de azul-violeta a violeta-verde.
- g) Finalmente influyen los aceptores de transferencia de energía.

La química y mecanismos de estas reacciones han sido estudiados por diversos autores, sin embargo en algunos casos el mecanismo de ciertas reacciones no se ha conseguido comprender en su totalidad y algunos análisis usan estas reacciones haciéndolo de forma inadecuada. En otros casos, las reacciones son extremadamente complejas y tienen numerosas vías de reacción, haciéndose entonces muy sensibles a diferentes factores y a la matriz de la muestra. Así pues existen numerosas consideraciones prácticas en el análisis QL relacionadas con los reactivos y con su pureza.

La emisión QL viene definida a través de cuatro parámetros, como son: el color, la intensidad, la velocidad de producción y caída de la intensidad.

Las condiciones de trabajo tienen un efecto muy significativo sobre el progreso de la reacción QL pudiendo obtenerse un amplio rango de velocidades, lo cual demanda desarrollos considerables de la instrumentación necesaria para conseguir medir la intensidad de quimioluminiscencia. Los tiempos de reacción y su duración oscilan desde valores muy cortos para procesos muy rápidos (< 1 segundo), hasta los que transcurren de forma muy lenta (> 1 día).

La intensidad de las reacciones QL viene dada por la expresión [1]:

$$I_{CL} = \phi_{QL} \frac{-dA}{dt} \quad (\text{ec. 2})$$

Desde el punto de vista analítico, la medida de la intensidad de emisión QL tiene gran importancia en la aplicación de esta reacción pudiendo hacerse de diferentes formas. La señal analítica puede ser tomada como la intensidad máxima de QL (altura máxima del pico), la señal después de un tiempo fijado desde el momento de la mezcla, la integral de la señal en un determinado periodo tiempo o la integral completa del pico, esto es, el área subtendida (Figura 1.2).

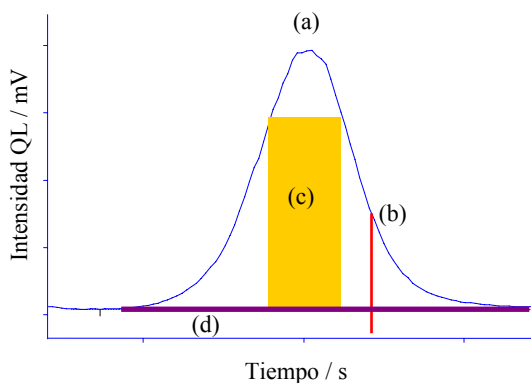


Figura 1.2 Formas de medir la señal analítica: (a) la altura máxima del pico; (b) la señal a un tiempo fijado; (c) la integral de la señal en un determinado periodo tiempo; (d) la integral del pico completo.

❖ Principales reacciones en fase líquida

Los sistemas establecidos mas utilizados para análisis corresponden a un número muy limitado de modelos, como los que se muestran en la Tabla 1.1. En el caso de la bioluminiscencia, la emisión es generada por parte de luciferinas catalizadas por luciferasas procedentes de distintos organismos.

Tabla 1.1 Sistemas más comunes quimioluminiscentes.

Substratos	Oxidantes
Luminol, Isoluminol	H ₂ O ₂ , O ₂ , MnO ₄ ⁻ , I ₂ , ClO ⁻
Lucigenina	H ₂ O ₂ , O ₂
Lofina	H ₂ O ₂
Peroxióxalatos: TCPO, DNPO	H ₂ O ₂ , aminas, Fenoles
Rodamina, uranina	MnO ⁴⁺ , ClO ⁻ , IO ₄ ⁻ , Ce ⁴⁺
Pirgalol	H ₂ O ₂
Ru(bpy)₃²⁺	Ce ⁴⁺ , Aminas alifáticas, C ₂ O ₄ ²⁻

❖ *Introducción de la muestra y reactivos*

Dependiendo de la configuración del dispositivo y del método de introducción de muestra y reactivos [3], los sistemas pueden clasificarse en: (a) estáticos (introducción de cantidades discretas de reactivos y muestra en un recipiente) y (b) sistemas en flujo.

- (a) En los sistemas estáticos, pequeñas porciones de muestra y reactivo QL se mezclan rápidamente en la cubeta de reacción, frecuentemente a temperatura controlada. Normalmente el reactivo final que inicia la reacción QL se adiciona con una jeringa o usando un inyector automático para conseguir una velocidad y volumen de inyección más reproducibles y una mejor sincronización de la adquisición de datos desde el inicio de la reacción. La

mezcla de los reactivos y la muestra se produce por la fuerza de la inyección, aunque a veces, se puede utilizar un agitador magnético. En estos casos, se registra la curva completa de intensidad de emisión de QL en función del tiempo de reacción. Esta técnica se usa en reacciones selectivas en disolución que muestran un alto rendimiento cuántico o un largo tiempo de emisión, como las reacciones bioluminiscentes, inmunoensayo quimioluminiscente o ensayos de hibridación quimioluminiscentes.

- (b) Los sistemas de QL en flujo continuo se usan en reacciones en disolución y en fase gaseosa. La muestra y los reactivos son continuamente bombeados y mezclados a través de un conector, en donde se produce la mezcla, que está muy próxima a la célula en donde se realiza la detección. La señal se observa cuando la célula está totalmente llena con la mezcla de reacción, a un tiempo predeterminado después de la mezcla. En estos casos, es posible obtener una señal constante y reproducible muy fácil de medir, y que representa la emisión total de la mezcla de reacción durante el tiempo que está en la célula. El óptimo de sensibilidad se consigue ajustando la velocidad de flujo y el volumen entre el punto de mezcla y el punto de observación con objeto de conseguir el perfil máximo de intensidad QL en función del tiempo. Como desventajas de esta técnica destacan el alto consumo de reactivo, el hecho de que no se obtenga ninguna información cinética y que solamente una pequeña porción de la intensidad de QL total es la que se mide cuando las reacciones son lentas. En el modo de inyección de flujo, el analito se incorpora a una disolución portadora, el reactivo va por una línea aparte y fluye continuamente siendo la muestra inyectada en la disolución portadora y a través de conectores o válvulas se mezcla con el reactivo, pa-

ra producir la reacción de QL, muy próxima a la zona de detección. En estas condiciones, la señal se obtiene como un pico estrecho que se corresponde con la alícuota de analito inyectada. Dependiendo de la situación, es posible llevar a cabo, no sólo la inyección de muestra sino que también, en el caso de que los reactivos quimioluminiscentes sean caros, incorporarlos del mismo modo que la muestra, con objeto de evitar un consumo grande de los mismos. Esta metodología tiene la ventaja de un bajo consumo, tanto de muestra como de reactivos y la utilización de una célula de menor volumen, evitando así una dilución excesiva; la señal es muy reproducible y precisa ya que se puede conseguir que se corresponda con la máxima altura del pico; además, es posible - en algunos casos - incorporar tratamientos químicos “on-line” para alcanzar una mayor selectividad.

❖ *Instrumentación*

La instrumentación necesaria puede ser tan simple como una cubeta, un sistema para adicionar reactivo y un dispositivo que mida la luz emitida, sin discriminar longitudes de onda.

Los sistemas de detección o dispositivos más usados para medir la señal QL son las cámaras CCD, tubos fotomultiplicadores y fotodiodos de silicio (Figura 1.3). Todos ellos tienen un límite en la medida de la respuesta espectral que viene dado por la relación señal/ruido (S/R). A la hora de elegir el detector más adecuado deberíamos elegir aquel con la mejor S/R a la longitud de onda máxima de la reacción quimioluminiscente debido a que la respuesta espectral puede ser no uniforme. Sin embargo, el límite de detección en la mayoría de los casos se determina teniendo en cuenta el valor de la señal de fondo del detector.

La señal de fondo se atribuye normalmente al blanco químico que corresponde a la QL debida a las sustancias contaminantes presentes en la mezcla de reacción [4]. Este fondo se puede minimizar empleando células de reacción miniaturizadas [4,5]. Existen sin embargo otras vías de reacción diferentes que pueden contribuir a la QL de fondo en algunos sistemas. Es bueno conseguir una alta amplificación (es decir una alta relación S/R), pero no siempre es posible disminuir la señal de fondo pues depende de numerosas variables experimentales [6].

Los luminómetros son los dispositivos que se emplean comercialmente en la detección de la quimioluminiscencia. Generalmente están constituidos por un tubo fotomultiplicador situado frente a la zona de medida. Hasta hace poco los luminómetros comerciales han estado basados en sistemas estáticos, donde la muestra se añade con una jeringa o un inyector automático. En particular la emisión máxima depende mucho de la velocidad de mezcla de reactivos y muestra. Este tipo de instrumento es útil para monitorizar reacciones que sean selectivas y tengan un rendimiento cuántico alto o un tiempo de vida largo, como ocurre en los inmunoensayos bioluminiscentes. No son útiles para monitorizar reacciones rápidas (<15s) de forma reproducible.

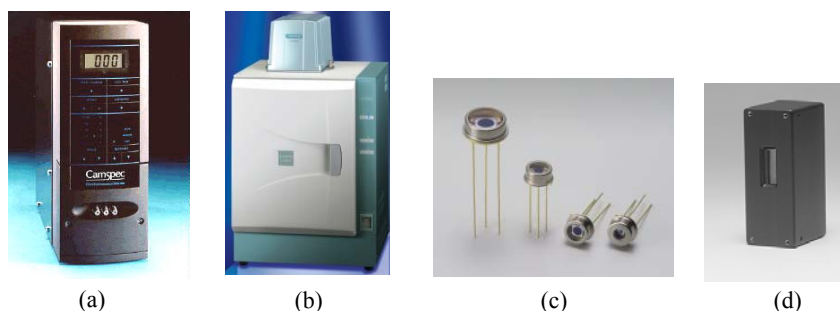


Figura 1.3 Instrumentación y componentes esenciales para la medida de la QL y BL: (a) Luminómetro; (b) Cámara CCD; (c) Fotodiodo; (d) Fotomultiplicador.

❖ *Limitaciones y aplicaciones*

La selectividad es una de las limitaciones analíticas de las medidas QL. Sin embargo una ventaja es su capacidad para acomodar un tratamiento químico on-line para conseguir aumentar la selectividad. También podemos realizar separaciones incluidas en la configuración o combinar la QL con la cromatografía líquida [7] o con la electroforesis capilar.

Para conseguir aumentar la sensibilidad y selectividad de la QL las condiciones de trabajo en cromatografía de líquidos se deben balancear para la separación cromatográfica con las condiciones óptimas para la obtención de la señal quimioluminiscente. Por ejemplo, la fase móvil idónea para la separación cromatográfica puede ser incompatible con las condiciones para la reacción QL.

Otros procedimientos alternativos son la derivatización precolumna seguida de otra postcolumna con detección QL; por ejemplo, la determinación de ácidos

carboxílicos por detección postcolumna con peroxioxalato usando derivatización precolumna con 3-aminoperileno. Las determinaciones QL con peroxioxalato y detección postcolumna son las más estudiadas por su capacidad para detectar analitos con fluorescencia nativa y compuestos derivatizados con marcadores fluorescentes; además las reacciones con peroxioxalato son compatibles con la elución en gradiente y con la derivatización de reactivos trabajando tanto en fase normal como inversa. Se han descrito características de diseño del equipo [8] y de combinación de columnas capilares de sílice fundida con la detección QL [7].

1.1.2. Electroquimioluminiscencia

❖ *Fundamentos*

Electroquimioluminiscencia es un fenómeno que consiste en la emisión de luz producida como resultado de reacciones electroquímicas. Generalmente, los reactivos son generados en uno o más electrodos, mediante reacciones de transferencia de electrones con uno o más reactivos químicos en solución. El proceso origina moléculas excitadas y la emisión quimioluminiscente se produce en zonas muy próximas al electrodo.

La primera observación del fenómeno fue realizada por Bancroft en 1914. En 1929 Harvey observa QL en el ánodo producida por electrolisis de luminol en medio básico. Entre 1963-1980 se incrementa el interés por el fenómeno con especial énfasis en el estudio de mecanismos de las reacciones, eficiencia de estados excitados, naturaleza del emisor, todos auxiliados por medidas espectroscópicas. Estos estudios han permitido conocer las propiedades fotoquímicas

y electroquímicas de nuevos compuestos y complejos, estudiar el mecanismo de reacciones orgánicas en las que se producen como productos intermedios radicales de vida corta.

❖ *Ventajas*

El empleo tanto de QL como de EQL presenta ventajas ya que no requiere de la etapa de excitación por irradiación de la muestra, como es necesario en la fotoluminiscencia, por ello no hay problemas de luz dispersa o de inestabilidad de la fuente, ni es necesario el uso de instrumentación compleja. Tampoco hay problemas de altas señales de fondo por fotoexcitación no selectiva, pudiendo lograrse alta sensibilidad con instrumentación simple.

La emisión QL generada se inicia y controla por mezcla de reactivos o por adecuado control del flujo de reactivos. En este punto es donde se encuentra la diferencia fundamental, y la gran ventaja del empleo de EQL, especialmente en formato de un solo uso o desechable como luego veremos, pues la luminiscencia en EQL se inicia y controla estableciendo un valor de potencial de electrodo o modificando el potencial entre valores preestablecidos. De esta manera los reactivos para generar QL son producidos *in situ* en la vecindad de la superficie del electrodo al que se ha aplicado el potencial y no por mezcla de reactivos, lo que permite un control preciso de la emisión [9,10]. Por lo tanto, la EQL con respecto a la QL tradicional, permite generar reactivos *in situ* cuando es necesario en un electrodo.

❖ *Mecanismos generales de EQL*

Existen diversos mecanismos generales de producción de EQL [11]:

1) EQL de aniquilación. Supone la reacción de transferencia electrónica entre iones radicales de carga opuesta generados en un electrodo por empleo de un potencial pulsado alternativamente, o mediante dos electrodos próximos, en presencia de una sustancia que sea emisora de EQL (Figura 1.4). Un ejemplo típico son los hidrocarburos aromáticos policíclicos [12] donde se involucran iones radicales aromáticos que pueden pertenecer a uno o dos precursores distintos a través de diferentes mecanismos dependiendo de que el sistema sea de energía suficiente o de energía deficiente [10].

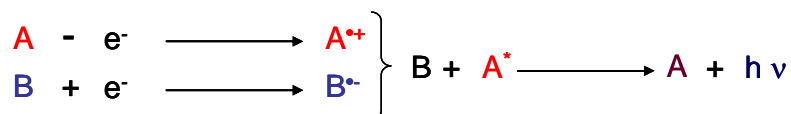


Figura 1.4 Mecanismo de aniquilación EQL.

2) EQL con correactante. El correactante es una especie que por oxidación o reducción produce un compuesto intermedio que puede reaccionar con un luminóforo EQL como es el complejo tris(2,2'-bipiridil)rutenio(II) [13] para producir una especie excitada. Esto suele ocurrir por ruptura de enlaces de los correactantes que dan lugar a oxidantes o reductores fuertes (Figura 1.5). Una típica reacción de este grupo es la que ocurre con el luminol que sufre una electro oxidación monoelectrónica a diazaquinona que a continuación se oxida por H_2O_2 o ión superóxido emitiendo EQL [14]. Este mecanismo es útil cuando los iones radicales no son suficientemente estables para la reacción de aniquilación

o cuando el disolvente tiene una ventana de potencial tan estrecha que no se pueden formar los iones radicales [15]. Con correctante, la EQL se genera aplicando un potencial en una dirección y dependiendo de la reacción que origine el emisor EQL podemos encontrar dos mecanismos, el de reducción oxidativa y el de oxidación reductiva [15].

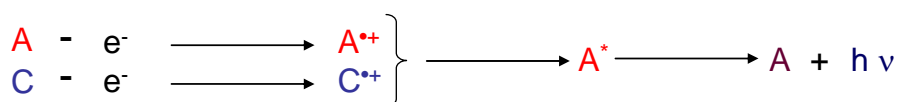


Figura 1.5 Mecanismo EQL con correctante (C).

3) EQL catódica. Se observa emisión a partir de electrodos de metal (Al, Ta) recubiertos de óxidos durante la reducción de sustancias como H_2O_2 , persulfato u oxalato, habiéndose sugerido que la EQL proviene de la inyección de “hot electrons” (electrones que no están en equilibrio térmico con la red en la que se encuentran) en la disolución acuosa de electrolito con la posible formación de electrones hidratados [16].

❖ Principales reacciones

Existen numerosos compuestos que producen EQL, e incluso en bibliografía pueden encontrarse tablas muy extensas sobre la aplicabilidad de esta técnica, como por ejemplo la completa revisión que realiza Richter [17]. Sin embargo, si se quiere simplificar a lo básico, las reacciones más utilizadas en EQL se resumen a tres, como viene esquematizado en la Tabla 1.2.

Tabla 1.2 Principales reacciones EQL.

Precursor (A)	Oxidante (B)
Metales complejos	$S_2O_8^{2-}$, $C_2O_4^{2-}$, TPrA
Luminol	H_2O_2 , O_2
$Ru(bpy)_3^{2+}$	TPrA, $C_2O_4^{2-}$, aminoácidos

❖ *Potencialidad EQL*

La EQL presenta una serie de características que la hace más atractiva frente a otras técnicas, como son:

1) Electro-iniciación de reacciones.

La estimulación electroquímica de reacciones permite mejorar el control de la velocidad de reacción, pudiendo incluso pararse y seguidamente realizar la detección, efectuando una corrección efectiva del fondo y posibilitando la lectura automática mediante control por ordenador. Podemos además seleccionar el material del electrodo, el tratamiento de la superficie, el potencial aplicado y otras mejoras de la selectividad.

Los reactivos pueden ser mezclados en origen, antes o en la célula de flujo para un sistema FIA. Puesto que la reacción comienza cuando se inicia la reacción electroquímica.

2) Electro-manipulación de reacciones.

Podemos generar reactivos electroquímicamente a partir de precursores en aquellos casos donde el reactivo es inestable ó podemos generar derivados que originan QL, cuando sus precursores no lo sean, aumentando así las

aplicaciones analíticas. Al generar reactivos electroquímicamente se evita la presencia de productos de reacción que se hubieran debido formar si medimos QL.

3) Combinación de técnicas.

Obtención de información combinada de espectroscopía y electroquímica. Oportunidad de obtener ganancia adicional de información analítica monitorizando la actividad electroquímica del analito por técnicas electroquímicas y realizando el registro simultáneo de la emisión QL. De igual manera la QL puede usarse para seguir el curso de reacciones electroquímicas.

❖ *Limitaciones de EQL*

Existe la posibilidad de generar electroquímicamente interferentes que pueden originar reacciones alternativas que pueden llegar a atenuar las especies excitadas. Por ello, a veces es necesaria la separación previa del analito antes de la detección.

Es difícil obtener valores reproducibles de las condiciones óptimas de los parámetros que controlan ambos procesos, electroquímico y quimioluminiscente, resultando finalmente unas condiciones de compromiso.

El empleo de EQL en Química Analítica es creciente y su uso se centra fundamentalmente en técnicas como HPLC, CE, LC y Bioensayos [12].

❖ *Instrumentación*

Son pocos y recientes los instrumentos comerciales disponibles para llevar a cabo las medidas de EQL tal y como los existentes para medidas de QL. Estos analizadores constan de un luminómetro, un potenciostato (Figura 1.6), una

celda conteniendo los electrodos y un sistema de tubos para conducir los distintos fluidos. Por ello, una solución bastante común suele ser utilizar el material existente en los laboratorios para efectuar medidas con celdas electroquímicas, una caja negra para conseguir aislar la emisión QL y un espectrofotómetro con la lámpara apagada ó un fotomultiplicador debidamente preparado que permite trabajar con mayor comodidad para limpieza de los electrodos, etc.

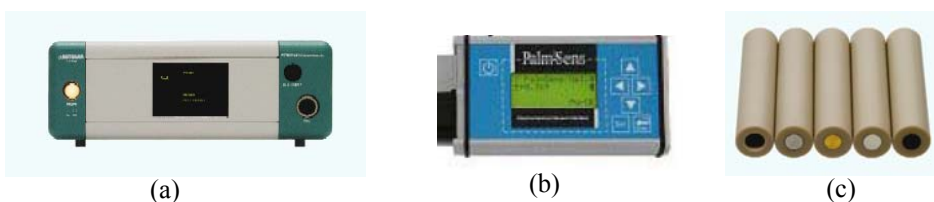


Figura 1.6 Instrumentación electroquímica para la producción EQL: potenciostato de sobremesa (a) ó portátil (b) y electrodos (c).

Normalmente son necesarios tres electrodos, un electrodo de referencia, un electrodo auxiliar y un electrodo de trabajo. Existen distintas configuraciones como las de electrodos en forma de anillo con disco rotatorio (RRD) dobles o simples. Con el RRD, el disco produce la especie oxidada y el anillo la reducida. Podemos modificar la velocidad de reacción de las especies oxidadas con las reducidas simplemente modificando la velocidad de giro [18]. Se usa para estudiar cinéticas de reacciones, pero no sirve para estudios de EQL en FIA aunque presenta un gran número de aplicaciones.

En las configuraciones de electrodo doble, los electrodos pueden estar juntos o separados, dependiendo de si las especies son estables o inestables. En primer

lugar, las especies formadas para cada electrodo se difunden y reaccionan entre el pequeño espacio existente entre los mismos. Posteriormente, las especies formadas en el primer electrodo son transportadas y reaccionan con las producidas en el segundo electrodo. Los electrodos de estas configuraciones son planos, de superficie pequeña y en algunos casos uno de los electrodos al menos es transparente.

La solución más sencilla es usar electrodos simples, de esta manera solo una especie es generada en el electrodo de trabajo para producir EQL.

Varios materiales han sido usados para los electrodos de trabajo en EQL tales como Pt, Au, carbón vitrificado y pasta de carbón (Figura 1.6.c). El tipo de superficie ejerce un marcado efecto sobre la señal y el uso continuando las deteriora provocando disminuciones de intensidad y de reproducibilidad de las medidas EQL. Una vez regenerada la superficie [19] son estables durante al menos 40 horas.

Las células de flujo que usan FIA para medidas EQL son laminares, en ellas la solución test fluye entre una fina capa a modo de sandwich colocada entre una ventana de vidrio a través de la cual se produce la observación y la superficie del electrodo de trabajo (Figura 1.7) el volumen y la forma de la célula viene definida por un espaciador inerte [19]. Generalmente el contraelectrodo está situado alejado del electrodo de trabajo para evitar interferencias de alguna especie que se puedan formar en el mismo. Otras veces el contraelectrodo de acero forma parte del cuerpo de la célula de flujo. El electrodo de referencia generalmente puede formar parte de la célula o posicionarse junto a ella; también se

usan pseudo-electrodos de referencia de Ag o Pt que proporcionan una referencia estable y que además tienen la ventaja de poder construirse fácilmente, no contaminar y ser compatibles con sistemas de electrolitos acuosos y orgánicos.



Figura 1.7 Celda de flujo para determinaciones electroquímicas con electrodos serigrafados de Dropsens.

Los potenciostatos comerciales pueden emplearse pero debido a la necesidad de variar el potencial en forma compleja es necesario que estén controlados mediante software especializado.

Los detectores usados son similares a los empleados en QL, para conseguir buenos límites de detección generalmente se usan tubos fotomultiplicadores. También se usan fotodiodos [20] con la ventaja de poder formar parte de la célula de flujo; son sensibles al rojo y a la zona del espectro visible siendo además pequeños, robustos, económicos además de funcionar con una fuente de bajo voltaje. Esta instrumentación no incorpora sistemas de discriminación de longitud de onda.

Se han descrito también sondas EQL. Los diseños contienen pequeñas reservas de reactivos que incorporan los electrodos y mediante una fibra óptica se transporta la señal al luminómetro. Kuhn y col. [21] escriben un modelo con electrodo en forma de micro-anillo de oro rodeado por fibra óptica. Preston y Nieman [22] describen una sonda que no necesita ser aislada de la luz exterior en su construcción, siendo en su estructura similar a una sonda de pH. Este dispositivo ha empleado como reactivos luminol y complejos de rutenio.

1.2. Características del Análisis por Inyección en flujo (FIA)

La automatización en Química Analítica implica la sustitución parcial o completa de la participación humana en el proceso analítico. Para automatizar el proceso analítico es necesario el uso de un analizador, los cuales pueden trabajar sin la presencia de un operador o necesitar la participación humana en algunas partes del proceso. Según como se realiza el tipo de transporte de muestras y reactivos, los analizadores pueden ser discontinuos, robotizados o continuos.

Dentro de los analizadores continuos se pueden distinguir dos modalidades: de flujo segmentado y de flujo no segmentado, dependiendo de que existan o no burbujas de aire en el flujo con el fin de separar las muestras evitando la contaminación entre las mismas.

La modalidad de flujo no segmentado se caracteriza por la ausencia de burbujas de aire en el sistema hidrodinámico. Las muestras se introducen de forma secuencial en el analizador, mediante inyección, inserción o aspiración y en él se llevan a cabo las distintas etapas del proceso hasta el paso de la muestra por el detector. Una diferencia fundamental de esta modalidad respecto a los de flujo

segmentado es que en el momento de producirse la detección no se ha alcanzado ni el equilibrio físico (homogeneización del flujo) ni químico (desarrollo completo de la reacción analítica).

Los sistemas donde un volumen de muestra se inserta en el flujo de forma controlada se denominan de Análisis por Inyección en Flujo (FIA), y si la muestra se aspira de forma continua se trata de analizadores de flujo totalmente continuo.

Existen otras modalidades de analizadores de flujo no segmentado pero destacaremos entre ellas el Análisis por Inyección Secuencial (SIA). Fue introducido por Ruzicka y Marshall [23] en 1990 y está considerado como un sistema de flujo de segunda generación. Consiste en la aspiración secuencial de muestra y reactivo, mediante una válvula de selección múltiple hacia un reactor, en el que a continuación y mediante un cambio en el sentido del flujo, la mezcla se lleva hacia el detector. Posee un control automático y preciso en la manipulación de muestras y reactivos, genera menores desechos y menor gasto de reactivos aunque la instrumentación necesaria es más costosa [24].

De todos estos métodos nos detendremos brevemente en el Análisis por Inyección en Flujo (FIA), por ser el que usaremos en esta Memoria de Doctorado.

El FIA es un tipo de análisis de flujo continuo que presenta varias ventajas con respecto a los métodos de flujo continuos tradicionales: mayores frecuencias de muestreo (normalmente entre 100 y 300 muestras/hora), mejores tiempos de respuesta, mejores tiempos de inicio y parada del sistema, y, exceptuando el

sistema de inyección, utiliza una instrumentación más simple y flexible. Las últimas dos ventajas indicadas son muy importantes, ya que hacen que se pueda automatizar de forma económica y factible, ya que el detector monitoriza constantemente la señal (ya sea absorbancia, fluorescencia, quimioluminiscencia, potencial de electrodo o cualquier otra propiedad física que se pueda medir de forma continua en la célula de flujo). Cualquier punto del pico obtenido en función del tiempo puede usarse para realizar la medida, ya que este puede ser obtenido repetidamente de forma reproducible, aunque normalmente se usa la altura de pico como parámetro analítico porque se puede medir muy fácilmente.

1.2.1. Componentes de un analizador FIA

Atendiendo a la instrumentación, nos encontramos con que los métodos FIA suelen constar de varios módulos: 1) módulo de propulsión, 2) módulo de inserción o inyección, 3) módulo de transporte, 4) módulo de reacción y 5) detector. Ocasionalmente puede tener otros elementos como mezcladores o sistemas separativos. De éstos últimos hablaremos más adelante.

❖ Módulo de propulsión

Normalmente, las disoluciones son propulsadas mediante una bomba peristáltica (Figura 1.7), como la empleada en esta Memoria (Figura 1.8), en la cual el líquido es presionado por unos cilindros en un tubo de plástico o goma por el que circula. Suelen tener de 8 a 10 cilindros colocados de tal manera que la mitad de ellos está presionando el tubo flexible, bombeando así la disolución. La velocidad de flujo se controla de dos formas: 1) modificando la velocidad de giro del rotor, y con ello la de los cilindros y 2) variando el diámetro del tubo flexible. Existen otros tipos de bombas usadas en FIA, como las de pistón, pero

generalmente son más caras, y además solo permiten mover un canal al mismo tiempo, mientras que las peristálticas suelen permitir cuatro, con lo que se necesitarían varias bombas en caso de necesitar varias corrientes de flujo. Deben proporcionar un flujo constante y regular al sistema.



Figura 1.8 Bomba peristáltica Gilson Minipuls-3.

❖ *Sistema de inserción o inyección*

El inyector consiste en una válvula de seis vías con un bucle externo acoplado a la misma similar a las empleadas en HPLC. La inserción debe realizarse de forma precisa y reproducible y su uso es fácil, cómodo y rápido. Los volúmenes de muestra insertados, del orden de microlitros, pueden variarse en un amplio rango, lo que aumenta la versatilidad del sistema. Pueden usarse jeringas, como en los primeros estudios de FIA, aunque hoy día se usan válvulas rotatorias de seis vías y un inyector proporcional.

❖ *Sistema de transporte*

Es el responsable del llevar las disoluciones y conectar entre sí los diferentes elementos. La configuración elegida en el sistema de transporte produce un determinado grado de dispersión del bolo de muestra y afecta a la señal analítica. Debe conseguirse un flujo constante y reproducible para poder realizar los diversos experimentos necesarios.

Los conductos usados en los esquemas FIA consisten en tubos de plástico, normalmente de PVC o politetrafluoroetileno (PTFE), con diámetros internos de 0,1-2,0 mm. Como norma en FIA la longitud de la tubería debe ser lo menor posible para minimizar el efecto de dilución de la muestra inyectada por efecto de la dispersión. Las conexiones de estas tuberías se hacen a través de conectores de plástico (PEEK).

❖ *Sistema de reacción*

Es el módulo donde se facilita la mezcla de muestra y reactivos y, en consecuencia, la reacción química. Pueden ser de muchos tipos, generalmente son tubos con distintos rellenos. Pero también puede usarse el mismo tubo usado en el transporte enrollado de forma helicoidal. Para conseguir aumentar la velocidad de la reacción química este tubo puede introducirse en baños termostatados. Su longitud es importante por afectar a la dispersión del sistema.

❖ *Sistema de Detección*

El sistema FIA es compatible con cualquier tipo de detector siempre y cuando sea capaz de medir en continuo. Los sistemas de detección en FIA más usados son principalmente cualquiera de las diferentes técnicas analíticas ópticas y electroquímicas.

Los detectores ópticos son los más usados en FIA, debido a la gran cantidad de sustancias orgánicas e inorgánicas que presentan propiedades ópticas detectables. Y a la posibilidad de transformación de especies no detectables en otras que lo son mediante la simple derivación por adición de los reactivos necesarios. Las dos técnicas más usadas son la espectrofotometría y la luminiscencia molecular [25].

1.3. Separaciones en analizadores FIA

En las metodologías FIA muchas veces es necesario incluir una etapa de separación para conseguir mejorar la selectividad del método. Existen diversas posibilidades que incluyen separaciones líquido-gas, líquido-líquido y sólido-líquido para dotar al sistema de suficiente selectividad. Las más utilizadas son las que reúnen las características idóneas para poder adaptarse a un proceso en continuo, estas son la diálisis, la extracción líquido-líquido y diversos procesos de tipo cromatográfico que tienen lugar con fases sólidas. Las fases sólidas más usadas son: a) cambiadores iónicos derivados de polímeros de estireno, b) cambiadores iónicos derivados de polímeros de dextrano; c) resinas adsorbentes sin grupos funcionales y d) sílice con fases enlazadas.

Las fases sólidas se han incorporado en esquemas tipo FIA de muy diversas formas [25,26]. Normalmente se basan en la inclusión de una o varias fases sólidas formada por partículas de un determinado tamaño empaquetadas y situadas en distintos lugares, fuera o dentro de la célula de flujo. A modo de ejemplo podemos citar algunos de los sistemas utilizados:

- a) Separación usando una mini-columna *on line* situada justo delante de la célula de flujo junto con la retención transitoria de analitos en la célula de flujo rellena de fase sólida. Las fases sólidas de la minicolumna y la célula de flujo pueden ser iguales o distintas. En la minicolumna se retiene uno de los analitos mientras que en la célula de flujo se retiene al otro analito. De esta forma como vemos se pueden determinar dos analitos como máximo [27-29].
- b) Uso de una mini-columna para la retención transitoria de un analito mientras que el segundo se mide cuando fluye a través de las partículas de fase sólida que rellenan la célula de flujo. El primer analito se mide una vez se eluye de la mini-columna y se retiene en la fase sólida situada dentro de la célula de flujo [30,31].
- c) Empleo de diferencias en retención transitoria entre ambos analitos. La retención transitoria de un analito en la parte superior de una célula de flujo, lejos del área de medida, hace posible medir que es menos retenido permitiendo de esta manera su resolución [32,33].
- d) Solo se emplea una fase sólida en la célula de flujo donde se retiene uno de los analitos mientras que el otro queda en la solución intersticial donde es medido [34,35].

- e) Empleo de minicolumnas para realizar separaciones de tipo cromatográfico.
- f) Uso de aproximaciones quimiométricas sin separación real de los analitos antes de la medida [36,37].

Estos métodos aquí citados, así como otros existentes en bibliografía, son sencillos, baratos y fiables y con buenas características analíticas, pero tienen una baja capacidad de separación a excepción del citado en último lugar y que a continuación vamos a tratar. La solución de este problema puede ser un incremento de la cantidad de fase estacionaria presente, de manera que los analitos sufran una mayor retención, pudiendo separarse así mezclas más complejas al aumentar la eficacia de la zona de retención. Otra posible solución es disminuir el tamaño de partícula del soporte sólido, aumentando de esta manera el número de partículas en un mismo volumen, y con ello, la retención de los analitos. Sin embargo, ambas soluciones tienen un gran inconveniente: el aumento de presión, debido, en el primer caso, a la mayor cantidad de fase estacionaria, y en el segundo al mayor empaquetamiento de las partículas de fase sólida, disminuyendo el volumen intersticial por el que fluye la fase móvil. Por lo tanto, usando este tipo de soportes sólidos como sistemas de separación, estos métodos están condenados al análisis de muestras sencillas, y con no más de dos analitos de interés. Una solución para lograr el incremento de la capacidad separativa de los analizadores tipo FIA es el empleo de sólidos monolíticos. A continuación trataremos brevemente de estos materiales junto con su uso en sistemas de inyección en flujo.

1.4. Sólidos monolíticos

Las columnas monolíticas consisten en una única pieza, rígida o semirrígida, de un material con estructura porosa bimodal. Por una parte presentan macroporos (0,5 – 2 μm de diámetro) a través de los cuales fluye el caudal del portador, y por otra mesoporos, mucho menores en tamaño (2-50 nm), que son los responsables de las interacciones entre los analitos y la fase estacionaria. Pueden llevar a cabo análisis rápidos debido a que el flujo pasa a través de los poros que atraviesan la columna a altos caudales y con presiones de trabajo muy bajas, al contrario que las columnas empaquetadas tradicionales. La funcionalidad del monolito se puede establecer a medida de las necesidades [38].

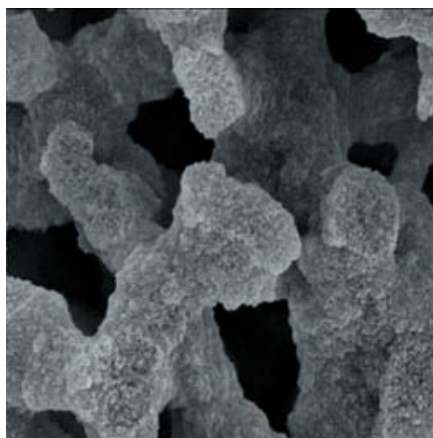


Figura 1.9 Imagen de la estructura porosa bimodal de los sólidos monolíticos.

A pesar de que son materiales de reciente aparición [39,40], pues se describen en las últimas décadas, están siendo ampliamente utilizados para diversos fines, y en muy poco tiempo, debido a las excelentes propiedades que presentan. El número de publicaciones referentes a columnas monolíticas ha aumentado casi

exponencialmente. En la Figura 1.10 podemos ver como ha aumentado este número de publicaciones referentes a columnas monolíticas en los últimos años.

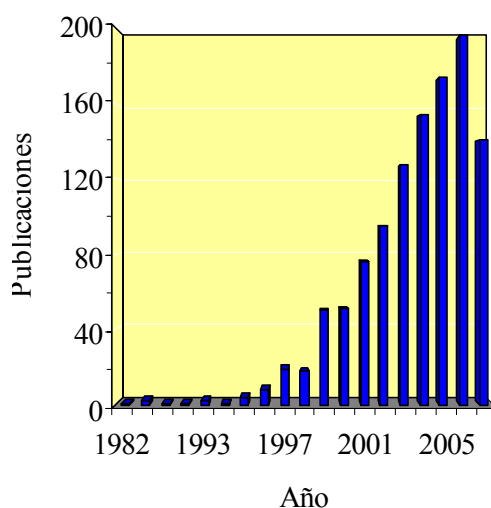


Figura 1.10 Número de publicaciones acerca de columnas monolíticas en cromatografía por año hasta fin de 2008. Se ha obtenido buscando “monolithic column chromatography” en SciFinder Scholar, versión 2006, ACS.

1.4.1. Columnas monolíticas: tipos y usos

Una de las tendencias actuales en Química Analítica es la miniaturización de las técnicas de análisis, ya que con ello se consigue reducir el consumo de reactivos químicos, se mejoran las separaciones y se obtienen excelentes selectividades, además de reducir el tamaño, aumentando así la portabilidad del dispositivo, y consiguiendo de esta forma el poder realizar medidas *in situ*. Estas técnicas miniaturizadas emplean el uso de pequeñas cantidades de muestra, con la im-

portancia que ello conlleva, por ejemplo, en técnicas biomédicas. Actualmente, uno de los caminos para obtener esta miniaturización en cromatografía líquida es la preparación de columnas unificadas, en lugar de empaquetadas, que se puedan usar en diferentes modos, como, por ejemplo, electro-cromatografía capilar (CEC) o micro-HPLC.

En electro-cromatografía capilar, una de las opciones desarrolladas para conseguir esta miniaturización es usar capilares rellenos con una fase estacionaria monolítica. Estos monolitos se pueden considerar como una única partícula con estructura porosa que actúa como fase estacionaria. Generalmente estos monolitos poseen mejores prestaciones que las columnas empaquetadas tradicionales, que presentan dos problemas fundamentales: la baja transferencia de masa y las limitaciones causadas por la presión del sistema. En el caso de la cromatografía de gases, el desarrollo de columnas abiertas ofrece una solución a ambos problemas permitiendo usar columnas capilares, donde llegan a alcanzarse un número extremadamente alto de equilibrios y los analitos son detectados midiendo propiedades específicas de los gases, lo que les confiere alta sensibilidad. Sin embargo, esto no se consigue en cromatografía líquida debido a la baja difusión desde la fase móvil a la fase estacionaria y viceversa. Para poder usarlas, estas columnas abiertas en cromatografía líquida deben ser capilares diminutos (entre 10 y 60 μm de diámetro interno) con delgadas películas de fase estacionaria (0,2 μm) [41], pero esto restringe la cantidad de muestra a analizar, originando dificultades de detección de los analitos.

En un principio, el desarrollo de los monolitos se pensó para ayudar a subsanar las dificultades asociadas a las columnas capilares empaquetadas, obteniendo

además otra ventaja fundamental: la eliminación de los topos o fritas usados en estas columnas empaquetadas con el fin de retener la fase estacionaria dentro de la columna. Esto hace que la estructura completa de la columna sea homogénea. En las columnas empaquetadas existen heterogeneidades lo que se traduce en diferentes propiedades. Se sabe que las fritas están asociadas con la reducción de la eficiencia de separación de la columna, y son responsables de la formación de burbujas durante el análisis. Además, son difíciles de fabricar dentro del capilar, pudiendo influir en el ensanchamiento de banda, catalizar la formación de burbujas o desestabilizar el flujo osmótico [42-44].

Las primeras columnas monolíticas se obtuvieron a partir de espumas de poliuretano en la década de los 70, para cromatografía líquida y gaseosa. Kubin y col. [45] fueron los primeros que prepararon una matriz polimérica continua para cromatografía de exclusión por tamaños. Usaron un gel de poli(1-hidroxi)etil metacrilato muy hinchado para la separación de proteínas, pero la permeabilidad de este medio continuo era demasiado baja. En 1979 Pretorius y col. introdujeron la primera espuma continua basada en sílice porosa [46]. El problema es que estas espumas no pudieron ser evaluadas desde el punto de vista cromatográfico ya que el surfactante usado para obtenerlas nunca fue identificado. Posteriormente, en 1989, Hjertén [47] investigó sobre los geles ligeros, a los cuales llamó lechos continuos. Tanto las espumas como los geles tenían un problema básico: eran incapaces de resistir las presiones asociadas con caudales elevados, limitando así el análisis rápido debido a su debilidad mecánica. Este problema se solventó cuando Svec y col. [48] introdujeron los primeros monolitos poliméricos rígidos para electrocromatografía capilar (CEC). Nakanishi y Soga [49] describieron una técnica para la obtención de una estructura porosa de

silíce monolítica para HPLC. Este monolito tenía una alta permeabilidad y una estructura biporosa. Sin embargo, debido a las dificultades en su procesado su desarrollo se vio retrasado hasta 1996 [50]. Además, en ese mismo año, Fields introdujo un segundo método para obtener un monolito silíceo para HPLC [51], pero la heterogeneidad de este monolito limitó su uso. Más tarde, en 2000, los monolitos de sílice para HPLC basados en el método de Nakanishi empezaron a comercializarse por parte de la empresa Merck [52], siendo éstas unas de las columnas monolíticas más empleadas hoy día en cromatografía.

Atendiendo a la naturaleza de la matriz monolítica, podemos clasificar estos materiales en dos grupos: los polímeros orgánicos (basados en polimetacrilatos, poliestirenos o poliacrilamidas) y los polímeros inorgánicos (con esqueleto de sílice). Dentro de cada uno de los grupos se pueden encontrar dos subgrupos, uno para CEC y otro para HPLC, ya que los monolitos se han usado extensamente como soportes cromatográficos en CEC. De hecho, la mayor parte del desarrollo en el campo de los monolitos se ha hecho dentro de la rama de la CEC, para luego ser extrapolado a la cromatografía líquida (HPLC).

1.4.2. Monolitos de polímeros orgánicos

Para CEC

La diferencia entre electroforesis capilar (CE) y electrocromatografía capilar (CEC) es la inclusión en esta última de una fase estacionaria hidrofóbica, normalmente empaquetada en el interior de un capilar, del mismo tipo que los usados en HPLC. Este empaquetamiento de partículas le otorga ciertas ventajas

sobre la CE, como es la capacidad para separar moléculas neutras siguiendo el mismo mecanismo que en HPLC en fase inversa, y un incremento en la capacidad de muestra [53,54]. El resultado es que la CEC presenta unas eficiencias muy elevadas (del orden de 120.000 platos/m) [55]. Sin embargo, las columnas para CEC son difíciles de empaquetar, requiriendo, como se ha indicado anteriormente, fritas en los extremos de la columna para retener las partículas.

Para sintetizar uno de estos monolitos orgánicos hay que situar la mezcla de monómeros, iniciador, entrecruzador y disolvente porogénico en un molde, que aquí sería el capilar. El disolvente porogénico actúa como emulsionante, creando poros en la estructura. Para iniciar la polimerización se puede calentar la mezcla o tratarla con luz ultravioleta. El monolito resultante se lava para eliminar los excesos de monómeros y de disolvente y, si es necesario, se funcionaliza con una fase estacionaria apropiada.

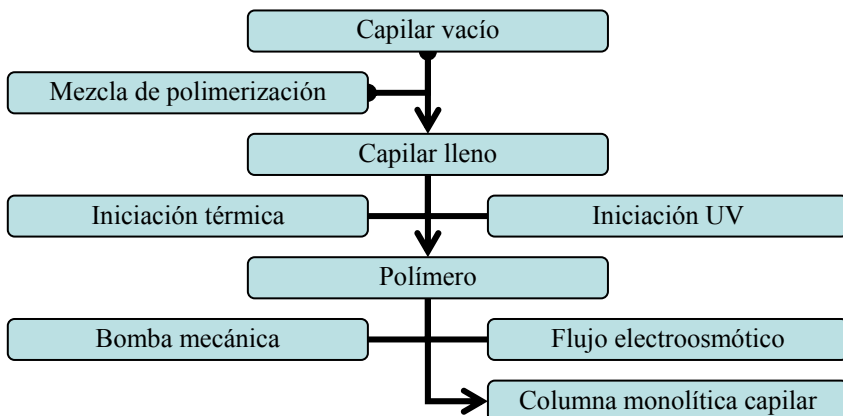


Figura 1.11 Esquema para la preparación de un monolito orgánico para CEC [56].

Los tres tipos de monolitos que mayor atención han despertado son:

- a) Polimetacrilatos: son los más comunes en CEC. Fueron desarrollados por Svec y Fréchet en 1995 [57]. Estos monolitos tienen grupos epoxi muy reactivos que permiten la funcionalización en línea recta, incluyendo la adición de grupos amino [57] y grupos cargados para el intercambio aniónico o catiónico [58,59].
- b) Poliestirenos: fueron desarrollados por Wang, Svec y Fréchet en 1993 [60]. Están basados en un esqueleto fenólico que le da sus características hidrofóbicas, pudiendo usarse sin funcionalización alguna. Sin embargo, estos monolitos carecen de la selectividad de la fase estacionaria por excelencia en HPLC: el octadecilsilano (ODS).
- c) Poliacrilamidas: tanto los geles comprimidos como los monolitos basados en poliacrilamidas se han usado en CEC [61,62], en micro HPLC [63] y en cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) [61]. Estos monolitos pueden producirse funcionalizados o no.

Para HPLC

Muchos de los monolitos orgánicos desarrollados para CEC han sido ensayados también en condiciones de micro-HPLC [61,63,64]. Xie en 1999 fabricó un monolito orgánico típico para HPLC (4,6 mm de diámetro interno) basado en un polímero de poli(estireno-divinilbenceno) para la separación de proteínas [65]. En este trabajo separaron cinco proteínas en menos de 20 segundos. Sin embargo, la separación de cinco péptidos no fue posible, aparentemente, debido a la falta de selectividad de esta fase estacionaria. Por otro lado, Maruska y col.

describieron el desarrollo de otro polímero obtenido a partir de poliacrilamidas para micro-HPLC en fase normal que alcanzó los 150.000 platos/m [66].

Al contrario que en CEC, los polímeros orgánicos no van tan bien para las aplicaciones HPLC debido a que HPLC es una técnica separativa de alta presión, y los monolitos orgánicos poseen una resistencia mecánica muy baja, además de sufrir procesos de hinchamiento con los disolventes que normalmente se usan en HPLC.

1.4.3. Monolitos de polímeros inorgánicos

Para CEC

La mayoría de los monolitos inorgánicos para CEC presentan una base silícea y están fundamentados en tecnología sol-gel o en técnicas de consolidación de partículas por calentamiento (sinterizado). Ambos métodos pueden usar partículas cromatográficas (por ejemplo con una fase estacionaria enlazada) para originar la separación de analitos neutros mientras los hidroxilos superficiales del esqueleto silíceo sustentan el flujo electroosmótico. Estos monolitos presentan las partículas de sílice enlazadas dentro de la columna, formando la estructura reticular del monolito.

Como ejemplo de sinterizado, Asiae describió un proceso de sinterizado de partículas en el cual las partículas de sílice eran fijadas dentro de la columna usando un proceso de calentamiento en dos etapas [67]. El capilar se rellenaba con partículas de sílice C₁₈ y se sometía al proceso de calentamiento para obte-

ner el monolito poroso. Después se vuelve a funcionalizar con dimetiloctadecil-clorosilano porque debido al proceso de sinterizado se destruye la fase estacionaria. El monolito obtenido poseía mejor estabilidad y fortaleza mecánica que las columnas empaquetadas.

El proceso de sol-gel, por su parte, consiste en la formación de un cristal de sílice a baja temperatura y presión atmosférica. El entramado reticular se obtiene a través de la hidrólisis de un alcoxisilicato seguido de una condensación y de una polimerización [64]. El resultado es un entramado tridimensional de sílice porosa.

Para incorporar las partículas al monolito, hay dos procedimientos:

- a) Atrapando partículas: conlleva rellenar un capilar empaquetado (con partículas) con una mezcla de monómeros y dejar que polimerice [68,69], obteniendo como resultado una red que atrapa y conecta las partículas, el polímero y la pared del capilar. A partir de la polimerización ya no es necesario el uso de fritas.
- b) Cargando partículas: supone inyectar una mezcla de partículas cromatográficas y agentes gelificantes dentro de un capilar de sílice fundida vacío [43]. Zare y colaboradores diseñaron una técnica para cargar partículas creando una matriz inorgánica porosa con partículas de 3 μm usando una suspensión sol-gel [70]. Debido a las heterogeneidades en la red, la eficiencia de esta era más baja (80.000 platos/m) que las columnas típicas de CEC, mientras que las inconsistencias en la suspensión origina baja reproducibilidad interco-

lumna. En 2000, Tang y Lee crearon una red sol-gel incorporando partículas de 3 μm con una eficiencia mucho mayor (175.000 platos/m) [71], aunque originaba unas fuertes interacciones con analitos de carácter básico. Ishizuka y colaboradores prepararon una red de sílice continua para CEC sin partículas [72] obteniendo una eficiencia de columna de 128.000 platos/m con largos poros a través de la misma.

En resumen, los monolitos inorgánicos para CEC se están investigando, pero solo recientemente han sido capaces de ofrecer la alta selectividad encontrada en los monolitos orgánicos. Aun hoy en día se están desarrollando métodos para la manufactura reproducible de monolitos inorgánicos para CEC.

Para HPLC

En la literatura hay descritos dos tipos de soportes continuos de sílice: xerogeles y silicatos policondensados. En 1996, dos grupos independientes describieron técnicas para obtener monolitos para aplicaciones en cromatografía líquida. Fields y col. [51] introdujeron un xerogel rígido formado a presiones atmosféricas para micro-LC y Minakuchi y col. [50] introdujeron la policondensación de silicatos para análisis en HPLC.

El xerogel desarrollado por Fields fue obtenido dentro de un capilar de sílice fundida de 0,32 mm de diámetro interno. Su eficiencia fue estudiada usando benzoato y naftaleno con detección UV. El monolito se creó calentando un silicato potásico dentro del capilar de sílice fundida, y después fue derivatizado

con dimetiloctildecilclorosilano para funcionalizar la fase estacionaria. Sin embargo, el monolito era heterogéneo, presentando malas características cromatográficas (solo 5.000 platos/m).

Minakuchi [50] preparó y evaluó monolitos más largos (7,0 x 830 mm) creados basándose en el trabajo previo de Nakanishi [49,73,74]. El proceso es una reacción sol-gel en presencia de polímero soluble en agua. El producto es una columna monolítica consistente en una única pieza de sílice con una distribución porosa bimodal (macroporos a través del monolito y mesoporos) bien definida. Los monolitos se encapsulan después de su producción por un proceso termorretráctil de PTFE (polytetrafluoroetileno) [50,75] ó de PEEK (polieteretercetona) [76], ambos mediante calor. Una vez encapsulados se funcionalizan con una fase estacionaria de dimetiloctildecilsilano. La estructura de los monolitos consiste en esqueletos de sílice de 0,3-5 μm , poros longitudinales de 0,5-8 μm y mesoporos de 2-20 nm [50]. El monolito sintetizado por Minakuchi tiene un esqueleto estructural más regular que el xerogel como se muestra en la Figura 1.12. La porosidad de estas columnas monolíticas ha sido estimada en más del 80%, medida mediante cromatografía de exclusión por tamaños usando tetrahidrofurano como fase móvil y patrones de poliestireno y alquilbenceno como muestra.

Desde 2000 la empresa Merck comercializa un producto basado en el método sol-gel de Nakanishi [49] y el método de encapsulamiento de Tanaka [76]. El reciente desarrollo de las columnas monolíticas ofrece nuevas posibilidades para realizar análisis rápidos en HPLC.

En esta Tesis Doctoral se emplea una de estas columnas monolíticas comercializadas por Merck: Chromolith RP-18 (realmente, precolumnas monolíticas), en fase reversa, con cadenas C_{18} , y de medidas 5 x 4,6 mm (especialmente dise-

ñadas para HPLC), y la de discos monolíticos QA (de amina cuaternaria) basados en un monolito de glicidimetacrilato-co-etilenglicoldimetacrilato con grupos de amina cuaternaria enlazados, y de medidas 3 x 12 mm (disponibles comercialmente de la mano de BIA Separations (Ljubljana, Eslovenia).

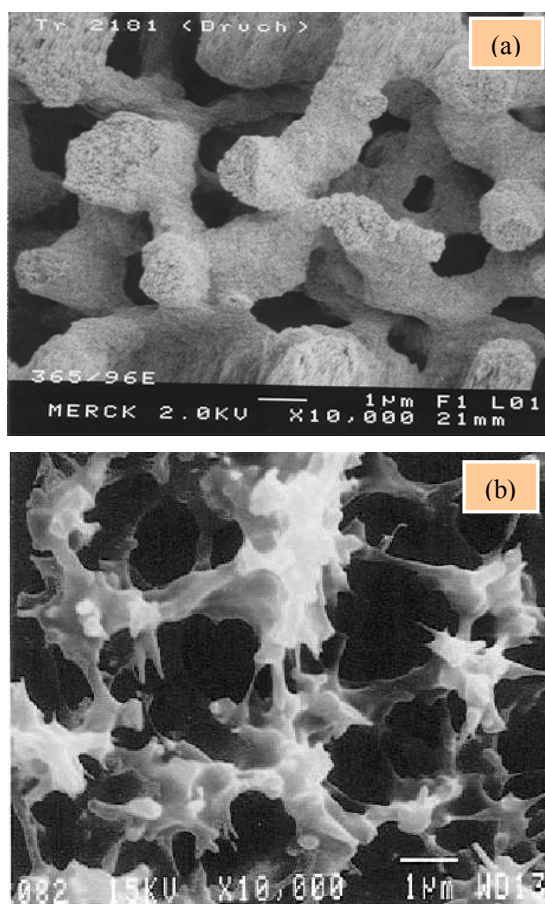


Figura 1.12 Formación de los monolitos vía (a) policondensación (Minakuchi) y (b) silicato (Fields).

1.4.4. Combinación de columnas monolíticas con sistemas de flujo

Estos materiales han encontrado una amplia aplicación en ciencias separativas debido a su alta permeabilidad y a la reducida pérdida de carga que muestran. Así se han usado en cromatografía de diverso tipo incluyendo cromatografía de gases, cromatografía de líquidos tanto en HPLC [40] como en cromatografía de baja presión [77,78] y diversos tipos de electroforesis capilar [41] tanto usando instrumentación convencional como dispositivos microfluidicos [79].

La combinación de técnicas de flujo con columnas monolíticas da como resultado un sistema cromatográfico de baja presión capaz de separar mezclas de analitos que se puede considerar como una metodología de bajo costo para lograr la necesaria selectividad en análisis [80]. De esta forma la combinación del análisis por inyección en flujo (FIA), análisis por inyección secuencial (SIA) o análisis por inyección en flujo multijeringa (MSFIA) con cromatografía utilizando columnas monolíticas da como resultado la denominada FIA/HPLC híbrida [81,82], cromatografía de inyección secuencial (SIC) [83] o cromatografía líquida multijeringa (MSC) [80], ampliando de esta manera las posibilidades de las técnicas de flujo.

La combinación de técnicas de flujo con columnas monolíticas se ha usado para diversas determinaciones, principalmente usando detección ultravioleta o conductimétrica. Se han determinado diversas mezclas de principios activos, así amoxicilina, ampicilina y cefalexina [80], lidocaína y prilocaina [84], nafazolina y metilparaben [83], Ambrosoli, metilparaben y ácido benzoico [85,86], una

mezcla de seis alcaloides opiáceos (morfina, pseudomorfina, codeína, oripavina, ethilmorfina y tebaína) y cuatro aminas biogénicas (ácido vanilmandélico, serotonina, ácido 5-hidroxiindol-3-acético y ácido homovanilínico) en orina humana [81] o la mezcla de paracetamol, cafeína y ácido acetilsalicílico [87].

Se han propuesto procedimientos para determinación de aditivos en alimentos y cosméticos, así la mezcla de cuatro parabenos [88], la mezcla de los edulcorantes aspartato y acesulfamo [89], la de los antioxidantes propilgalato y butilhidroxianisol [90] o la de la mezcla de edulcorantes aspartamo, acesulfamo y sacarina, conservantes metilparaben, etilparaben, propilparaben y butilparaben y antioxidantes propilgalato y butilhidroxianisol [91]. Se ha utilizado para contaminantes como son hidrocarburos aromáticos policíclicos [92] y para mezclas de cationes y aniones, así nitrito, nitrato, bromuro, yoduro y tiocianato [93], fosfato, cloruro, nitrito, nitrato, bromuro, clorato, sulfato, cobre, magnesio, calcio, estroncio y bario [94], yodato, cloruro, nitrato, bromuro, nitrito, fosfato y sulfato [77] o fluoruro, bromato, cloruro, nitrito, fosfato, bromuro, nitrato, clorato, sulfato [78].

1.5. Ensayos rápidos y sensores desechables

Los ensayos rápidos combinan técnicas analíticas simples, portátiles y baratas con procedimientos de análisis sencillos para la identificación y/o determinación de sustancias. Estos ensayos rápidos son de muy diverso tipo, realmente son difíciles de clasificar, y entre ellos encontramos desde reacciones en disolución con observación visual o medida instrumental, a volumetrías con cuantogotas, medida de la longitud o radio de zonas coloreadas u otros.

Todos estos sistemas tienen de común el que se pueden llevar a cabo fuera del laboratorio de análisis habitualmente por razones de privacidad u oportunidad y sus resultados no suelen tener la misma calidad que los obtenidos en las condiciones controladas de un laboratorio, aunque la diferencia de objetivos perseguidos justifica su uso. Sin embargo la exigencia a la hora de caracterizarlos suele ser idéntica a la de cualquier método analítico propuesto.

Uno de estos sistemas rápidos son los sensores desechables, también llamados tiras reactivas o sensores de gota plana. Son dispositivos analíticos autocontenidos usados a veces junto con instrumentación portátil. Estas formulaciones analíticas incluyen todos los reactivos necesarios para hacer un análisis en estado sólido y en contacto con el problema inician una serie de reacciones o procesos que conducen a la determinación del analito presente [95,96].

Hay diferentes tipos de estrategias para el diseño de estos dispositivos, pero todos pretenden el ser lo más independientes posible, de los habituales requerimientos del análisis químico, tales como muestreo, tratamiento de muestra, instrumentación, personal entrenado y laboratorio [95]. Los sensores desechables, nombre con que los denominaremos a lo largo de esta Memoria, deben de cumplir una serie de condiciones como son: ausencia de manipulación de reactivos y disolventes, sencillez de uso, robustez, facilidad de lectura de resultados, inmediatez, bajo costo y que no precisen para su empleo de un entrenamiento especial.

Estos dispositivos cubren necesidades de información en casa o a pie de cama por parte de usuarios no cualificados, aunque hay otras muchas, como pueden ser laboratorios de rutina de análisis clínicos o investigaciones de campo por parte de geólogos, policía científica o servicios de vigilancia ambiental con diversos objetivos, para así poder determinar de forma rápida valores de parámetros clínicos en orina y sangre (la conocida como Química Seca). También se pueden usar en procedimientos de muestreo para seleccionar que muestras tomar, para monitorizar valores límite en control de procesos, para determinar componentes lábiles, por ejemplo en aguas naturales, mediante análisis *in situ*, o para estimación de niveles de analitos que permitan establecer una estrategia de análisis. Incluso para cuestiones tan aparentemente nimias como la verificación de muestras, por ejemplo, cuando se sospecha una confusión de las mismas [97,98].

Los sensores desechables se pueden clasificar en dos categorías o formatos diferentes: 1) los basados en observación visual y 2) los que realizan una medida instrumental.

1) Los primeros se basan en los papeles reactivos, el más conocido de los cuales es el papel de pH. Pretenden clasificar la muestra atendiendo a un parámetro de interés en algún subgrupo de concentraciones. De esta manera se obtiene una información semicuantitativa, basada en la capacidad de discriminación entre colores del ojo humano. Este es el caso de dureza o nitratos en agua. Alternativamente, pueden ser de tipo disyuntivo (si/no) según se supere un determinado valor de concentración, a veces un límite legal. Están diseñados para que sea perceptible por encima de ese nivel, así un test de embarazo [99].

2) Los basados en una medida instrumental utilizan una medida cuantitativa que suministra una información más fiable y precisa que la simple distribución en categorías. La transducción utilizada en este tipo de dispositivos puede ser de diverso tipo, siendo las más habituales y por este orden: a) electroquímica, basada en amperometría, técnicas de redisolución, potenciometría, o conductimetría; b) óptica, basada en absorción molecular UV-Vis, reflectancia difusa, o emisión luminiscente (fluorescencia, fosforescencia, quimioluminiscencia, electroquimioluminiscencia); c) piezoeléctrica; d) comparación visual; y e) otras. Dentro de las electroquímicas, los sensores desechables amperométricos son los de mayor uso, aunque otros, como los potenciométricos, son de interés. Dentro de los sensores desechables ópticos, los más usados son los que se basan en medidas de reflectancia difusa, aunque también son muy usados en espectrofotometría y fluorescencia, tanto directa como usando campo evanescente y en menor medida o más raramente, otros como en quimioluminiscencia.

En este tipo de sistemas analíticos, la dimensión comercial y económica es mayor que en otras técnicas y procedimientos, y prueba de ello es el empleo habitual de patentes y modelos de utilidad como forma de protección de resultados. Es frecuente que sean desarrollados por empresas, ya que las características que deben presentar, no solo analíticas sino de estabilidad, robustez mecánica, precio, etc., hacen que sea necesaria una tecnología media/alta para compatibilizar prestaciones y costo. No obstante, suponen una oportunidad de negocio para muchas empresas por el volumen de potenciales clientes que existen y de hecho en la actualidad es un próspero campo de actividad y negocio para muchas em-

presas como Merck, Macherey-Nagel, Kyoritsu, Hach, LaMotte Company, Industrial Test Systems, etc.

Las ventajas de este tipo de sistemas analíticos ya han sido señaladas. Los inconvenientes se refieren al carácter semicuantitativo de muchos de ellos, su baja exactitud, su escasa capacidad para el análisis de trazas, su carácter dedicado para un tipo de analito en una matriz dada, lo que hace que tengan escasa versatilidad, salvo que se demuestre su utilidad.

Los sensores desechables se han utilizado para la identificación o determinación de analitos a través de diversas estrategias. De una manera general, para lograr el reconocimiento el ligando o reactivo se une químicamente o se entrapa físicamente cerca de la interfase o en el interior de la membrana sensora o bien se inmoviliza directamente sobre su superficie. La señal se genera a partir de la interacción con el reactivo, quien cambia sus propiedades por reacción con el analito, bien él solo o con el concurso de reacciones acopladas.

Los procesos de reconocimiento deben estar basados en reacciones de suficiente selectividad, en conjunción con diversas operaciones analíticas para lograr obtener resultados sobre problemas reales, sin necesidad de tratamiento previo de muestra ni adición de reactivos. Por otra parte, deben estar diseñados de forma que sea fácil su manipulación, sean robustos en su uso, sean estables durante el almacenamiento y se pueda realizar la medida con seguridad, generalmente mediante el uso de instrumentos dedicados. Las reacciones que se usan van desde reacciones de complejación, a reacciones enzimáticas, reacciones antígeno-anticuerpo ó reacciones con ADN.

Los ensayos de fase sólida se pueden clasificar en dos grupos: sistemas verticales y sistemas horizontales, atendiendo a como se relaciona el problema conteniendo el analito con la tira reactiva o sensor desechable [95]. En los sistemas verticales el fluido atraviesa perpendicularmente la capa o capas que constituyen la zona reactiva sufriendo un conjunto de reacciones y procesos que permitirán desarrollar una propiedad analítica [100,101]. En los sistemas horizontales la muestra se deposita sobre una zona de recepción y se mueve por flujo fluido a través de la tira de ensayo produciéndose como consecuencia de esa migración separaciones cromatográficas, reacciones y/o retenciones de analito o interferentes, que originaran la propiedad analítica [102,103]. En esta Memoria de Doctorado solo trataremos de ensayos de tipo vertical, por lo que a ellos nos atenderemos en lo que continúa.

En los sistemas verticales se pretende integrar todas las operaciones analíticas necesarias en un único conjunto sobre el que vamos a aplicar la muestra, lo que provocará, tras la disolución de los reactivos, caso de que tenga que ocurrir, diferentes reacciones y procesos que concluirán con la realización de la medida. Los tipos de operaciones a realizar dependerán del tipo de problema y de las reacciones químicas usadas para su determinación.

Los reactivos en los sistemas verticales se encuentran en fase sólida y se pueden distribuir o bien a través de toda la matriz de la zona activa del sensor o bien pueden estar compartimentados en dominios específicos dentro de la infraestructura de la matriz. Esta distribución de reactivos y componentes necesarios se puede lograr de dos maneras: 1) mediante una única capa, los

llamados sistemas monocapa [104-106] ó 2) mediante un conjunto de capas diferenciadas que se encuentran apiladas, los llamados sistemas multicapas [107-110]. La mayor o menor complejidad del sistema dependerá del propio analito, de la complejidad de la matriz que lo contiene y de la selectividad de la reacción de reconocimiento.

1.5.1. Esquemas de sensado óptico

Para lograr la determinación o identificación de la especie de interés se han utilizado sistemas de muy diverso tipo dependiendo del analito y de la matriz en la que se encuentre. Refiriéndonos exclusivamente a analitos de naturaleza química y de forma general, el reconocimiento se logra mediante el empleo de un ligando o reactivo/s que se encuentran químicamente enlazados o físicamente retenidos cerca de la interfase o bien en el interior de la capa sensora o alternativamente, directamente inmovilizados en la superficie de la misma. La señal se genera a través del reactivo que cambia sus propiedades mediante reacción con el analito, bien solo o a través de reacciones acopladas. De esta forma se produce la señal y se logra la selectividad requerida por uso de procedimientos concurrentes de preconcentración o de separación.

La señal óptica se genera mediante la interacción del reactivo, que cambia sus propiedades ópticas por reacción con el analito, bien solo o con la ayuda de compuestos adicionales –cromoionóforo, fluoroionóforo, colorante indicador, reactivos auxiliares-.

Entre ellos podemos citar: a) reacciones redox, este es el caso de la determinación de yoduro basada en su oxidación a yodo y retención en una membrana de poliestireno como complejo con polivinilpirrolidona [111]; b) reacciones orgánicas, así la formación de azoderivados para nitrito [112,113,113-115] o para nitrato previa reducción [112,116,117]. También se puede citar dentro de este grupo la reacción con aminas aromáticas en presencia de cobre para cianuro [118] c) reacciones de precipitación o de disolución de precipitados, así para cloruro se han propuesto sistemas basados en cromato de plata[119], en barberina [120] o en el complejo de Ag(I) de 2,4,6- tri(2-piridil)-1,3,5-triazina [121]; para sulfato se ha propuesto un sistema basado en el complejo Arsenazo III-bario [122] y otro basado en el complejo ácido rodizónico-bario [123,124]; d) reacciones enzimáticas; muy habituales en análisis clínico, así para cloruro usando la catálisis por dipeptidilpeptidasa I (catepsina C) de la hidrólisis de oligopéptidos derivados [125] o para hidrógenocarbonato basándose en su carácter básico débil mediante una reacción indirecta en la que interviene una β -galactosidasa y un criptandano [125]; e) reacciones de complejación convencionales, así para vanadato [126] o para fosfato mediante la clásica reacción con molibdato y posterior reducción [127] o para borato con cúrcuma [127]; f) reacciones de sustitución de ligandos en complejos cromogénicos como la usada para fluoruros [127]; g) reacciones basadas en ionóforos, así se ha utilizado para cloruro basado en cloruro de triciclohexilestaño [128].

1.5.2. Sensores desechables quimioluminiscentes

Los sensores QL y EQL se han usado principalmente en formato de flujo y de sonda (fibra óptica) [9,129,130] y más escasamente en formato de un solo uso.

Los sensores QL de un solo uso descritos son principalmente enzimáticos o inmunológicos y la medida de QL se lleva a cabo mediante luminómetros de sobremesa [131,132], luminómetros portátiles [132] o diferentes tipos de películas fotográficas, especialmente películas instantáneas [133-135] mediante un densitómetro o un escáner [136] o incluso incorporando la película fotográfica en el elemento analítico como una capa fotosensible [137].

Se han descrito diferentes sensores de un solo uso quimioluminiscentes enzimáticos que son habitualmente elementos multicapa que contienen reactivos inmovilizados. Estos reactivos se pueden localizar: 1) en una capa de reactivos como en el sensor descrito para glucosa que contiene luminol, glucosa oxidasa y peroxidasa en una mezcla de gelatina y 1,2-bis(vinilsulfonilacetamido)etano [138] o encapsulados en microcápsulas osmosensibles para mejorar su vida útil; y 2) en varias capas, como en el caso sensor para glucosa con enzimas en un disco de microfibra de vidrio y luminol en una membrana de celofán [133]. Un ejemplo de sensores de un solo uso no enzimáticos ha sido el propuesto para H_2O_2 en agua de lluvia basado en una membrana de hidroxietil celulosa conteniendo cloruro de cobalto como catalizador y un surfactante [139].

Diferentes inmunoensayos de un solo uso de tipo QL tanto heterogéneos como homogéneos han sido descritos, entre los que se encuentran ensayos de hibridación de ácidos nucleicos y ensayos inmunoquímicos de tipo sandwich, competitivos y directos.

Las áreas comunes en la disposición de estos ensayos de tipo heterogéneo son la capa de reactivos y la capa de captura. La primera capa contiene el ligando marcado que se une inmunológicamente con los analitos. La etiqueta pueden ser enzimas [140,141] o proteínas bioluminiscentes tales como la aequorina [142]. La capa de captura contiene un agente de fijación que puede ser avidina, un antígeno, anticuerpo o un receptor inmovilizado por absorción o enlace covalente al portador, microesferas de vidrio o polímero, fibras o membranas, situados en la zona de difusión o en una capa alternativa inmediata que sea capaz o bien de competir con el analito por las posiciones de enlace del agente de fijación inmovilizado o bien unirse al complejo reactivo-analito. La separación de los compuestos marcados no fijados así como posibles interferentes de la zona de reacción previamente a la lectura QL se realiza por lavado y eliminación del líquido de lavado a una zona absorbente adyacente.

La aplicación de la química de detección en disolución (luminol, H_2O_2 , surfactantes, potenciadores) pone en marcha la reacción QL [131,132,140,141,143]. Alternativamente, después del lavar el reactivo marcado sin reaccionar de la membrana, se puede colocar junto a esa membrana una pieza de papel humedecido con la química QL para originar la emisión QL [144].

Como ejemplo de formatos homogéneos se puede citar un sensor de tres zonas en el que la segunda zona atrapa el ligando marcado que no ha reaccionado proveniente de la primera zona y la tercera zona contiene la química necesaria para desencadenar la respuesta QL [142].

El uso de estos sensores quimioluminiscentes de un solo uso se ha propuesto para peróxido de hidrogeno [139], hipoclorito [145], glucosa [133,138], teofilina [142], el herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético [144], los herbicidas atrazina, terbutilazina y ametrin [131], 4-n-nonilfenol [132], gonadotropina coriónica humana [140], y ensayos de hibridación de ADN [134,141], entre otros.

1.5.3. Sistemas analíticos con sensores electroquimioluminiscentes de un solo uso

Las mayores aplicaciones analíticas de EQL se refieren a la iniciación electroquímica de reacciones QL convencionales así las basadas en luminol o en el complejo tris(2,2'-bipiridil)rutenio(II) y en mucha menor medida en procesos de aniquilación, ya antes citados, por exigir trabajar en medios no acuosos [146].

La EQL ha sido utilizada como técnica analítica empleando diversos tipos de electrodos para desencadenar la reacción electroquímica promotora, principalmente se han usado macro-electrodos de carbón vítreo, sin embargo su empleo en sensores de un solo uso exige el empleo de otro tipo de configuraciones de pequeño tamaño y buenas prestaciones. Para ello se han utilizado configuraciones similares a las de los sensores electroquímicos de un solo uso. Estos son celdas electroquímicas autocontenidas en las que se coloca la muestra y se mide la propiedad eléctrica correspondiente en conexión con instrumentación portable o portátil. Se han utilizado diversas técnicas para la preparación de los sensores electroquímicos de un sólo uso considerando para ello la producción en masa, reproducibilidad y costo; principalmente mediante las técnicas de capa gruesa (serigrafiado) y las de capa delgada (litografiado) [95].

La primera estrategia, electrodos serigrafiados, ha sido la más usada para la preparación de sensores electroquimioluminiscentes de un solo uso. Así el grupo de L.J. Blum ha desarrollado un sensor para colina basado en la inmovilización de colina oxidasa sobre una celda electroquímica serigrafiada (grafito/Ag/AgCl) a partir de la que se mide la EQL usando instrumentación convencional, aunque es necesario añadir el problema en tampón conteniendo luminol. El rango lineal del procedimiento se extiende desde 10^{-8} hasta 10^{-4} M [147,148]. Otros ejemplos de electrodos propuestos han sido para tetraciclina [149] o para oxalato basado, en este último caso, en la inmovilización del complejo tris(2,2'-bipiridil)rutenio(II) [150]. También se han propuesto en formato biochip, un microarray de electrodos de grafito serigrafiados para la determinación multiparamétrica de glucosa y lactato [151]. De forma general se puede decir que el número de sensores de un uso de tipo electroquimioluminiscente descritos que contengan todos los reactivos inmovilizados es, de acuerdo con la bibliografía consultada, muy escaso.

1.5.4. Inmovilización de reactivos en sensores quimioluminiscentes y electroquimioluminiscentes

Se han utilizado diversos procedimientos para la inmovilización de reactivos en este tipo de sensores QL y EQL. Como ya antes se ha dicho no es habitual que se inmovilicen todos los reactivos necesarios sino solo algunos y sobre todo en sensores de tipo flujo, que son los más habituales, en los que el resto de los reactivos se llevan con una línea de flujo. Se pueden clasificar en dos grupos: 1)

Inmovilización de los reactivos de reconocimiento y 2) inmovilización de los reactivos de transducción.

Los reactivos de reconocimiento más usados son enzimas y se han usado diversos procedimientos: a) interacción electrostática en cambiadores iónicos como Sefarosa DEAE [152]; b) formación de membranas con complejos poliiónicos como puede ser con alcohol polivinílico conteniendo grupos estirilpiridinio [147] o poli-lisina con poli(4-estirenesulfonato) [153]; c) por entrapamiento o unión química con polímeros electrogenerados como pueden ser polipirrol, polianilina o polifenol [154]; d) uso de estructuras sol-gel [155,156]; e) uso de liposomas [157]; e) por adsorción, así en poliamidas [158]. Los reactivos de transducción quimioluminiscente más usados han sido luminol y el complejo tris(2,2'-bipiridil)rutenio(II) y su inmovilización se ha abordado desde diversos puntos de vista. El luminol muy frecuentemente se ha entrapado físicamente en membranas así de tipo sol-gel [159]; por interacción electrostática en cambiadores como Sefarosa DEAE [152] o por electropolimerización sobre electrodos y formación de membranas de polipirrol [160]. El complejo tris(2,2'-bipiridil)rutenio(II) ha sido inmovilizado en membranas de Nafion [161] aunque también formando pares iónicos en electrodos de pasta de carbon [162] o en composites como el sol-gel/chitosan [163]. Sin embargo se han usado, aunque en menor medida, otros reactivos como la luciferina que se ha encapsulado en microsferas de ácido acrílico [164]. Todas estas diferentes estrategias de inmovilización fueron empleadas en estudios fundamentales o en sensores de diverso tipo principalmente de flujo y sonda por lo que la información sobre sensores en formato de un solo uso es muy escasa y en todo caso está en fase de desarrollo.

1.6. Bibliografía

1. Garcia Campaña, A. M.; Baeyens, W. R. G. *Chemiluminescence in Analytical Chemistry*, 1 edition ed.; Marcel Dekker: New York, 2001.
2. C. Dodeigne, L. Thunus, R. Lejeune, *Talanta* 51 (2000) 415.
3. A.M. García Campaña, X. Zhang, Alés F, L. Gámiz, Baeyens W.R.G, *Ars.Pharm.* 42 (2001) 81.
4. D.H. Leaback, *Anal.Chim.Acta* 227 (1989) 1.
5. H.E. Hirsch, *J Neurochem* 16 (1969) 1147.
6. A. Townshend, *Analyst* 115 (1990) 495.
7. N.G.F.M. Lammers, J.H.M. van Den Berg, M. Verzele, C. Dewaele, *J.Chromatog.A* 499 (1990) 541.
8. K. Imai, R. Weinberger, *TrAC* 4 (1985) 170.
9. H.Y. Aboul-Enein, R.I. Stefan, J.F. Van Staden, *Crit.Rev.Anal.Chem.* 29 (1999) 323.
10. M.M. Richter, *Chem Rev.* 104 (2004) 3003.
11. R. Pyati, M.M. Richter, *Annual Reports on the Progress of Chemistry, Section C: Physical Chemistry* 103 (2007) 12.
12. K.A. Fahrnich, M. Pravda, G.G. Guilbault, *Talanta* 54 (2001) 531.
13. W.Y. Lee, *Mikrochim.Acta* 127 (1997) 19.
14. C.A. Marquette, L.J. Blum, *Anal.Chim.Acta* 381 (1999) 1.
15. J.P. Choi, A.J. Bard, *Anal.Chim.Acta* 541 (2005) 141.

-
16. S. Kulmala, C. Matachescu, A. Kulmala, D. Papkovsky, M. Hakansson, H. Ketamo, P. Canty, *Anal.Chim.Acta* 453 (2002) 253.
 17. M.M. Richter, *Chem.Rev.* 104 (2004) 3003.
 18. K.E. Haapakka, J.J. Kankare, *Anal.Chim.Acta* 138 (1982) 253.
 19. W.A. Jackson, D.R. Bobbitt, *Anal.Chim.Acta* 285 (1994) 309.
 20. A.W. Knight, G.M. Greenway, E.D. Chesmore, *Anal.Proc.* 32 (1995) 125.
 21. L.S. Kuhn, A. Weber, S.G. Weber, *Anal.Chem.* 62 (1990) 1631.
 22. J.P. Preston, T.A. Nieman, *Anal.Chem.* 68 (1996) 966.
 23. J. Ruzicka, G.D. Marshall, *Anal.Chim.Acta* 237 (1990) 329.
 24. P. Chocholous, P. Solich, D. Satinsky, *Anal.Chim.Acta* 600 (2007) 129.
 25. Valcárcel, M.; Luque de Castro, M. D. *Flow-Through (Bio)Chemical Sensors*, Elsevier Science B.V.: Amsterdam, 1994.
 26. J. Ruzicka, G.D. Christian, *Anal.Chim.Acta* 234 (1990) 31.
 27. P. Ortega Barrales, A. Dominguez Vidal, M.L. Fernández de Córdova, A. Molina-Diaz, *J.Pharm.Biomed.Anal.* 25 (2001) 619.
 28. M.J. Ruedas Rama, A. Ruiz Medina, A. Molina-Diaz, *Anal.Chim.Acta* 459 (2002) 235.
 29. L.F. Capitan-Vallvey, M.C. Valencia Miron, E. Arana Nicolas, J.F. Garcia-Jimenez, *Anal.Bioanal.Chem.* 385 (2006) 385.
 30. M.L. Fernández de Córdova, P. Ortega Barrales, G. Rodriguez Torne, A. Molina-Diaz, *J.Pharm.Biomed.Anal.* 31 (2003) 669.
 31. J.W. Costin, P.S. Francis, S.W. Lewis, *Anal.Chim.Acta* 480 (2003) 67.

-
32. L.F. Capitan-Vallvey, M.C. Valencia Miron, E. Arana Nicolas, *Anal.Chim.Acta* 503 (2004) 179.
 33. L.F. Capitan-Vallvey, M.C. Valencia Miron, E. Arana Nicolas, *J.Food Sci.* 68 (2003) 1595.
 34. M.C. Valencia Miron, F. Uroz, Y. Tafersiti, L.F. Capitan-Vallvey, *Quim.Anal.* 19 (2000) 129.
 35. L.F. Capitan-Vallvey, M.C. Valencia, E.A. Nicolas, *Mikrochim.Acta* 138 (2002) 69.
 36. M.J. Ayora Cañada, M.I. Pascual-Reguera, A. Molina-Diaz, L.F. Capitan-Vallvey, *Talanta* 49 (1999) 691.
 37. S. Ortega-Algar, N. Ramos-Martos, A. Molina-Diaz, *Talanta* 60 (2003) 313.
 38. H. Kobayashi, T. Ikegami, H. Kimura, T. Hara, D. Tokuda, N. Tanaka, *Anal.Sci.* 22 (2006) 491.
 39. G. Calleja, R. Van Grieken, J.A. Melero, *Anal.Quim.* Octubre-Diciembre (2003) 31.
 40. K. Cabrera, *J.Sep.Sci.* 27 (2004) 843.
 41. F. Svec, *LC-GC Europe* 16 (2003) 24.
 42. L.A. Colon, G. Burgos, T.D. Maloney, J.M. Cintron, R.L. Rodriguez, *Electrophoresis* 21 (2000) 3965.
 43. C.K. Ratnayake, C.S. Oh, M.P. Henry, *J.Chromatog.A* 887 (2000) 277.
 44. C.K. Ratnayake, C.S. Oh, M.P. Henry, *J.High Res.Chromatog.* 23 (2000) 81.
 45. M. Kubin, P. Spacek, R. Chromeczek, *Collection Czechoslov.Chem.Comm.* 32 (1967) 3881.

-
46. V. Pretorius, J.C. Davidtz, D.H. Desty, J.High Res.Chromatog.Chromatog.Comm. 2 (1979) 583.
 47. S. Hjerten, J.L. Liao, R. Zhang, J.Chromatogr. 473 (1989) 273.
 48. Q.C. Wang, K. Hosoya, F. Svec, J.M. Frechet, Anal.Chem. 64 (1992) 1232.
 49. K. Nakanishi, N. Soga, J.Am.Ceram.Soc. 74 (1991) 2518.
 50. H. Minakuchi, K. Nakanishi, N. Soga, N. Ishizuka, N. Tanaka, Anal.Chem. 68 (1996) 3498.
 51. S.M. Fields, Anal.Chem. 68 (1996) 2709.
 52. K. Cabrera, D. Lubda, H.M. Eggenweiler, H. Minakuchi, K. Nakanishi, J.High Res.Chromatog. 23 (2000) 93.
 53. E.C. Peters, M. Petro, F. Svec, J.M.J. Frechet, Anal.Chem. 70 (1998) 2288.
 54. E.C. Peters, M. Petro, F. Svec, J.M.J. Frechet, Anal.Chem. 70 (1998) 2296.
 55. C. Ericson, J.L. Liao, K. Nakazato, S. Hjerten, J.Chromatog.A 767 (1997) 33.
 56. F. Svec, E.C. Peters, D. Sykora, C. Yu, J.M.J. Frechet, J.High Res.Chromatog. 23 (2000) 3.
 57. F. Svec, J.M.J. Frechet, J.Chromatog.A 702 (1995) 89.
 58. Q. Luo, H. Zou, X. Xiao, Z. Guo, L. Kong, X. Mao, J.Chromatog.A 926 (2001) 255.
 59. C. Viklund, F. Svec, J.M.J. Frechet, K. Irgum, Biotechnol. Progr. 13 (1997) 597.
 60. Q.C. Wang, F. Svec, J.M.J. Frechet, Anal.Chem. 65 (1993) 2243.

-
61. S. Xie, F. Svec, J.M.J. Frechet, *J.Chromatog.A* 775 (1997) 65.
 62. A. Palm, M.V. Novotny, *Anal.Chem.* 69 (1997) 4499.
 63. Y.M. Li, J.L. Liao, K. Nakazato, J. Mohammad, L. Terenius, S. Hjerten, *Anal.Biochem.* 223 (1994) 153.
 64. S.A. Rodriguez, L.A. Colon, *Chem. Mat.* 11 (1999) 754.
 65. S. Xie, R.W. Allington, F. Svec, J.M.J. Frechet, *J.Chromatog.A* 865 (1999) 169.
 66. A. Maruska, C. Ericson, A. Vegvari, S. Hjerten, *J.Chromatog.A* 837 (1999) 25.
 67. R. Asiaie, X. Huang, D. Farnan, C. Horvath, *J.Chromatog.A* 806 (1998) 251.
 68. G. Chirica, V.T. Remcho, *Electrophoresis* 20 (1999) 50.
 69. Q. Tang, B. Xin, M.L. Lee, *J.Chromatog.A* 837 (1999) 35.
 70. M.T. Dulay, R.P. Kulkarni, R.N. Zare, *Anal.Chem.* 70 (1998) 5103.
 71. Q. Tang, M.L. Lee, *J.High Res.Chromatog.* 23 (2000) 73.
 72. N. Ishizuka, H. Minakuchi, K. Nakanishi, N. Soga, H. Nagayama, K. Hosoya, N. Tanaka, *Anal.Chem.* 72 (2000) 1275.
 73. K. Nakanishi, N. Soga, *J.Non-Crystall.Sol.* 139 (1992) 1.
 74. K. Nakanishi, N. Soga, *J.Non-Crystall.Sol.* 139 (1992) 14.
 75. K. Nakanishi, H. Minakuchi, N. Soga, N. Tanaka, *J. Sol-Gel Sci. Tech.* 8 (1997) 547.
 76. N. Tanaka, H. Nagayama, H. Kobayashi, T. Ikegami, K. Hosoya, N. Ishizuka, H. Minakuchi, K. Nakanishi, K. Cabrera, D. Lubda, *J.High Res.Chromatog.* 23 (2000) 111.

-
77. S. Pelletier, C.A. Lucy, *J.Chromatog.A* 1118 (2006) 12.
 78. D. Victory, P. Nesterenko, B. Paull, *Analyst* 129 (2004) 700.
 79. H.L. Zeng, H.F. Li, X. Wang, J.M. Lin, *Talanta* 69 (2006) 226.
 80. H.M. Gonzalez-San Miguel, J.M. Alpizar-Lorenzo, V. Cerda-Martin, *Talanta* 72 (2007) 296.
 81. J.L. Adcock, P.S. Francis, K.M. Agg, G.D. Marshall, N.W. Barnett, *Anal.Chim.Acta* 600 (2007) 136.
 82. E. Tyrrell, P.N. Nesterenko, B. Paull, *J.Liquid Chromatog.Rel.Tech.* 29 (2006) 2201.
 83. P. Chocholous, D. Satinsky, P. Solich, *Talanta* 70 (2006) 408.
 84. J. Klimundova, D. Satinsky, H. Sklenarova, P. Solich, *Talanta* 69 (2006) 730.
 85. D. Satinsky, J. Huclova, R.L.C. Ferreira, M.C. Montenegro, P. Solich, *J.Pharm.Biomed.Anal.* 40 (2006) 287.
 86. D. Satinsky, L.M.L. Dos Santos, H. Sklenarova, P. Solich, M.C. Montenegro, A.N. Araujo, *Talanta* 68 (2005) 214.
 87. D. Satinsky, I. Neto, P. Solich, H. Sklenarova, M. Conceicao, B.S.M. Montenegro, A.N. Araujo, *J.Sep.Sci.* 27 (2004) 529.
 88. J.F. Garcia-Jimenez, M.C. Valencia-Miron, L.F. Capitan-Vallvey, *J.Anal.Chem.* In press (2008) .
 89. J.F. Garcia-Jimenez, M.C. Valencia Miron, L.F. Capitan-Vallvey, *Anal.Lett.* 39 (2006) 1333.
 90. J.F. Garcia-Jimenez, M.C. Valencia, L.F. Capitan-Vallvey, *Journal AOAC International* in press (2007) .

-
91. J.F. Garcia-Jimenez, M.C. Valencia, L.F. Capitan-Vallvey, *Anal.Chim.Acta* 594 (2007) 226.
 92. P.N. Nesterenko, M.A. Rybalko, *Dokl.Chem.* 404 (2005) 178.
 93. B. Paull, C.O. Riordain, P.N. Nesterenko, *Chem.Comm.* (2005) 215.
 94. D. Connolly, D. Victory, B. Paull, *J.Sep.Sci.* 27 (2004) 912.
 95. Capitan-Vallvey, L. F. *Encyclopedia of Sensors*, Grimes, C. A.; Dickey, E. C.Pishko, M. V., Eds.; 1 ed.; The Pennsylvania State University: Pennsylvania, USA, 2005.
 96. Y. Zolotov, *Ann.Chim.* 87 (1997) 285.
 97. Sonntag, O. *Dry Chemistry. Analysis with Carrier-bound Reagents*, Elsevier Science Ltd: 1993.
 98. A. Zipp, W.E. Hornby, *Talanta* 31 (1984) 863.
 99. J. Greyson, *J.Autom.Chem.* 3 (1981) 66.
 100. Lange, H., Rittersdorf, W., Rey, H. G., *Diagnostic device*, US 3,897,214 (2001).
 101. G.-Q. Shi, G. Jiang, *Anal.Sci.* 18 (2002) 1215.
 102. R.S. Niedbala, H. Feindt, K. Kardos, T. Vail, J. Burton, B. Bielska, S. Li, D. Milunic, P. Bourdelle, R. Vallejo, *Anal.Biochem.* 293 (2001) 22.
 103. J.A.A. Ho, R.D. Wauchope, *Anal.Chem.* 74 (2002) 1493.
 104. Anand, K., Koon-Wah, L., *Reflective particle-containing analysis composition and device*, EP 0141647 (1985).
 105. Charlton, S. C., Hemmes, P., Lau, A. L. Y., *Ion test means having a hydrophilic carrier matrix*, US 4,649,123 (1987).

-
106. Mehta, D. V., Detecteur a reactif, son procede de preparation et son application a l'analyse chimique et biochimique, FR 2,303,290 (1976).
 107. H.G. Curme, R.L. Columbus, G.M. Dappen, T.W. Eder, W.D. Fellows, J. Figueras, C.P. Glover, C.A. Goffe, D.E. Hill, W.H. Lawton, E.J. Muka, J.E. Pinney, R.N. Rand, K.J. Sanford, T.W. Wu, Clin.Chem. 24 (1978) 1335.
 108. Clement, P. L., Integral element for analysis of liquids, US 4,042,335 (1977).
 109. Przybylowicz, E. P., Millikan, A. G., Integral analytical element, US 3,992,158 (1976).
 110. Kitajima, M., Arai, F., Kondo, A., Multi-layer chemical analytical materials, US 4,356,149 (1982).
 111. M.P. Arena, M.D. Porter, J.S. Fritz, Anal.Chem. 74 (2002) 185.
 112. V.G. Amelin, I.S. Kolodkin, J.Anal.Chem. 56 (2001) 182.
 113. Guardiola Vicente, J. M. La orina y su analisis, Quimica Farmaceutica Bayer, Ed.; Madrid, 1995.
 114. Kaminagayoshi, S., Test piece for detecting nitrite, EP 0160240 (1985).
 115. Small, P. A., Huang, S. H., Rapid diagnostic method for distinguishing allergies and infections, US 5,910,421 (6-8-1999).
 116. Boehringer Mannheim GmbH, Test Strips, GB1463434 (1977).
 117. Guonan, C., Haixia, L., Zenghong, X., Test paper for fast testing nitrite, azotate in vegetables and its testing method, CN 1445531 (2003).
 118. Carhart, H. W., Detector of hydrogen cyanide in air, US 2534229 (1950).
 119. Tobari, S., Nakano, M., Test composition, method and a test stick for detection of chloride ion in cow's milk, US 4,211,532 (1980).

-
120. Ogita, Z., Test paper for determining the concentration of halogen ions by filter paper chromatography, and manufacturing process for and use of the same, US 4,744,952 (1988).
 121. Ruperisi Lakshman, L. S., Liese, K., Bandelette et methode d' analyse pour la detection de taux eleves de chlorures pour des piscines et stations thermales, FR 2800166 (2000).
 122. V.M. Ostrovskaya, Yu. Zolotov, L.K. Shpigun, P.M. Kamilova, Yu.L. Shishkin, *Field Anal.Chem.Tech.* 4 (2000) 147.
 123. H. Starp, N. Buschmann, K. Cammann, *Fresenius J.Anal.Chem.* 368 (2000) 203.
 124. M.E. Tess, J.A. Cox, *J.Pharm.Biomed.Anal.* 19 (1999) 55.
 125. Berry, M. N., Town, M.-H., Kresse, G.-B., Herrmann, U., Determination of ions in fluids, US 5,409,814 (1995).
 126. Jaunakais, I., Jaunakais, J. K., Test device for detection of molybdate, vanadate and ferric ions, US 5,106,581 (1992).
 127. Macherey-Nagel. *Catalog Test Papers.* 2004.
 128. H. Hisamoto, N. Miyashita, K. Watanabe, E. Nakagawa, N. Yamamoto, K. Suzuki, *Sens.Actuators B* 29 (1995) 378.
 129. L.F. Capitan-Vallvey, M.C. Valencia Miron, R. costa Acosta, *Talanta* 51 (2000) 1155.
 130. Z. Zhang, S. Zhang, X. Zhang, *Anal.Chim.Acta* 541 (2005) 37.
 131. Rubtsova, M. Y.; Samsonova, J., V; Ezhov, A. A.; Egorov, A. M. *Bio-catalysis-2000: Fundamentals & Applications*, (2000) 33.
 132. J. Samsonova, V, M.Y. Rubtsova, M. Franek, *Anal.Bioanal.Chem.* 375 (2003) 1017.
 133. T.J.N. Carter, T.P. Whitehead, L.J. Kricka, *Talanta* 29 (1982) 529.

-
134. L.J. Kricka, X. Ji, *Anal.Sci.* 7 (1991) 1501.
 135. Hasegawa, A., Chemiluminescent analytical test strip and holder, JP 08184595 (1994).
 136. Khalil, O. S., Zurek, T. F., Genger, K. R., Curtis, P. J., Jou, Y. H., Cotter, S. M., Method and apparatus for heterogeneous chemiluminescence assay, US 5,089,424 (1992).
 137. Vogelhut, P. O., Chemiluminescent analytical device, US 4,231,754 (1980).
 138. Furuya, S., Imai, T., Hiratsuka, N., Ikeda, T., Kondo, A., Integral multi-layered analysis elements and their use in body fluid analysis for clinical diagnosis, JP 62103542 (1986).
 139. A. Tahirovic, A. Copra, E. Omanovic-Miklicanin, K. Kalcher, *Talanta* 72 (2007) 1378.
 140. Belly, R. T., Kopcienski, M. M., Erdrich, C., Kildal, M. A., Format for immunoassay in thin film, US 5,958,339 (1999).
 141. Akhavan-Tafti, H., Sugioka, K., Sugioka, Y., Reddy, L. V., Chemiluminescent detection methods using dual enzyme-labeled binding partners, US 5,843,666 (1998).
 142. Liotta, L. A., Christiansen, B. C., Day, A. R., Harlacher, T., Paweletz, K., Light-emitting immunoassay, US 5,942,407 (1997).
 143. Kissel, T. R., Friedman, A. E., Fingar, S. A., Chemiluminescent reagent and assay using a substituted acetanilide for light generation, US 5,705,357 (1998).
 144. M.Y. Rubtsova, G.V. Kovba, A.M. Egorov, *Biosensors Bioelectron.* 13 (1998) 75.
 145. J. Ballesta Claver, M.C. Valencia Miron, L.F. Capitan-Vallvey, *Anal.Chim.Acta* 522 (2004) 267.

-
146. A.W. Knight, *TrAC* 18 (1999) 47.
 147. B. Leca, L.J. Blum, *Analyst* 125 (2000) 789.
 148. B.D. Leca, A.M. Verdier, L.J. Blum, *Sens.Actuators B* B74 (2001) 190.
 149. L.j. Liu, X.w. Zheng, Z.J. Zhang, X.p. Zhang, N.n. Zhang, *Shaanxi Shifan Daxue Xuebao, Ziran Kexueban* 31 (2003) 79.
 150. Z.y. Lin, J.h. Chen, J.j. Sun, G.N. Chen, *Guangpuxue Yu Guangpu Fenxi* 26 (2006) 1996.
 151. B.P. Corgier, C.A. Marquette, L.J. Blum, *Anal.Chim.Acta* 538 (2005) 1.
 152. C.A. Marquette, L.J. Blum, *Sens.Actuators B* B90 (2003) 112.
 153. F. Mizutani, S. Yabuki, Y. Hirata, *Anal.Chim.Acta* 314 (1995) 233.
 154. S. Cosnier, *Biosensors Bioelectron.* 14 (1999) 443.
 155. A. Navas Diaz, M.C. Ramos Peinado, M.C. Torijas Minguez, *Anal.Chim.Acta* 363 (1998) 221.
 156. I. Pastor, R. Esquembre, V. Micol, R. Mallavia, C.R. Mateo, *Anal.Biochem.* 334 (2004) 335.
 157. S. Godoy, B. Leca-Bouvier, P. Boullanger, L.J. Blum, A.P. Girard-Egrot, *Sens.Actuators B* 107 (2005) 82.
 158. C.A. Marquette, A. Degiuli, L.J. Blum, *Appl.Biochem.Biotechnol.* 89 (2000) 107.
 159. L. Zhu, Y. Li, F. Tian, B. Xu, G. Zhu, *Sens.Actuators B* 84 (2002) 265.
 160. A. Sassolas, L.J. Blum, B.D. Leca-Bouvier, *Anal.Bioanal.Chem.* 390 (2008) 865.
 161. T.M. Downey, T.A. Nieman, *Anal.Chem.* 64 (1992) 261.

162. J. Li, M. Huang, X. Liu, H. Wei, Y. Xu, G. Xu, E. Wang, *Analyst* 132 (2007) 687.
163. L. Zhang, Z. Xu, S. Dong, *Anal.Chim.Acta* 575 (2006) 52.
164. P.E. Michel, S.M. Gautier-Sauvigne, L.J. Blum, *Talanta* 47 (1998) 169.

Capítulo 2

ANÁLISIS DE PARABENES EN COSMÉTICOS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA A BA- JA PRESIÓN CON COLUMNA MONOLÍTICA Y DETECCIÓN QUIMIOLUMINISCENTE

“El descubrimiento de las leyes de la naturaleza es como tratar de aprender las reglas del ajedrez a base de observar partidas”



*Richard Philip Feynman (1918-1988)
Premio Nobel de Física en 1965*

“Nada es demasiado difícil si alguien es capaz de hacerlo”



*Archer John Porter Martin (1910-2002)
Premio Nobel de Química en 1952*

CAPÍTULO 2: ANÁLISIS DE PARABENES EN COSMÉTICOS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA A BAJA PRESIÓN CON COLUMNA MONOLÍTICA Y DETECCIÓN QUIMIOLUMINISCENTE

Antes de empezar su discurso, Harald Cramér, miembro de la real sociedad académica de ciencias, se dirigió a los premiados: “Dr. Martin y Dr. Synge, lo admirable de los métodos cromatográficos desarrollados por ustedes presentan un carácter de genio y simplicidad, el cual nunca impedirá la admiración de las personas. ¡En lugar de hablar de Colón y su famoso huevo, de ahora en adelante se hablará de Martin y Synge y la mancha en el papel! Las aplicaciones de sus métodos analíticos para la química y la biología son en realidad numerosas e importantes, y podemos confidencialmente preveer ver otras incluso de mayor importancia en el futuro.”

*Discurso de Harald Cramér
Descubrimiento de la cromatografía de partición
Fundación Nobel, 1953, Estocolmo. Suecia*

2.1. Introducción

La combinación de la cromatografía con las técnicas de flujo ofrece algunas características interesantes. Los métodos de flujo presentan ventajas como la simplicidad, bajo coste, versatilidad, velocidad y, generalmente, buenas prestaciones analíticas, pero no permiten la separación de una mezcla de analitos. La cromatografía líquida a su vez es una técnica bien establecida que tiene una alta selectividad y rendimiento, pero requiere de una instrumentación más costosa y complicada que las técnicas de flujo. Esto justifica la combinación de técnicas tales como el análisis por inyección en flujo (FIA) [1,2], análisis por inyección secuencial (SIA) [3] o el análisis por inyección en flujo multijeringa (MSFIA) [4] con las separaciones cromatográficas a baja presión para lograr una metodología selectiva de bajo coste.

La clave para la combinación de estas técnicas consiste en el empleo de columnas monolíticas. Estas están formadas por un polímero monolítico poroso rígido con alto grado de entrecruzamiento, estructura bien definida y con distribución bimodal del tamaño de poro, conteniendo mesoporos para la retención de analitos y macroporos para el flujo que los atraviesa facilitando una buena separación y presentando una alta estabilidad química y buenas condiciones de flujo, llegando a alcanzar hasta unos $15 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ [5-7].

Han sido utilizadas diferentes combinaciones de técnicas de flujo y materiales monolíticos para separar mezclas de principios activos [1,3,4,8-11], contaminantes como son los hidrocarburos aromáticos policíclicos [12] o mezclas de cationes y aniones inorgánicos [7,13-15]. En todos estos métodos los detectores utilizados fueron detectores de fila de diodos DAD (Diode Array Detector) o detectores conductimétricos.

La quimioluminiscencia (QL) es un fenómeno observado cuando el producto excitado vibracionalmente de una reacción exérgica se relaja a su estado fundamental con emisión de fotones, y ha sido ampliamente utilizada como método de detección en diferentes técnicas como HPLC, electroforesis capilar, cromatografía en capa fina o FIA [16]. Existen diferentes tipos de reacciones químicas que se utilizan para generar emisión quimioluminiscente, aunque una de las más versátiles es la combinación de Ce(IV) y Rodamina 6G. Esta reacción ha sido aplicada en FIA para determinar diferentes compuestos como son captopril [17], clorpromazina [18], fentolamina [19], hidroclortiazida [20], tiazida [21], ácido ferúlico [22] o parabenos [23]. En todas estas determinaciones tipo

FIA no se utilizaron etapas separativas sino la determinación directa del analito o en mezcla en matrices no interferentes. Este planteamiento limita muy considerablemente su aplicabilidad.

La detección QL ha sido utilizada escasamente en sistemas cromatográficos de baja presión empleando columnas monolíticas. Así, Adcock y col. [1] propusieron un sistema híbrido HPLC/FIA para la separación de seis alcaloides y cuatro aminas biogénicas utilizando una columna monolítica de 25 mm de longitud y detección QL basada en la reacción del tris-(2,2'-bipiridil) rutenio (III) y permanganato. Por otro lado Paull y col. [2] utilizaron un disco monolítico de tipo quelante basado en grupos iminodiacético de 3 mm de longitud para la retención selectiva Cu(II) basándose la detección QL en la reacción de la 1,10-fenantrolina con peróxido de hidrógeno.

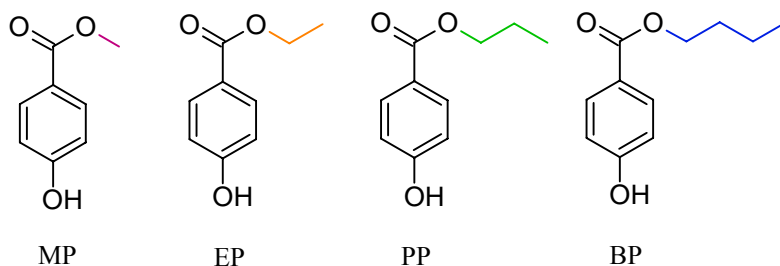


Figura 2.1 Estructura molecular de los cuatro parabenos ensayados en este capítulo: metilparaben (MP), etilparaben (EP), propilparaben (PP), y butilparaben (BP).

Los parabenos son series homólogas del ácido p-hidroxibenzoico esterificado en el carbono 4 del anillo bencénico, con grupos metil, etil, propil o butil, lo que

resulta en los compuestos metilparaben (E-219), etilparaben (E-215), propilparaben (E-217) y butilparaben (Figura 2.1).

Estos compuestos son utilizados ampliamente como bactericidas en alimentos, bebidas, productos farmacéuticos y cosméticos [24,25]. Su presencia en cosméticos, especialmente en consumidores que los usan a diario y en grandes cantidades, puede inducir dermatitis alérgica por contacto [26,27]. Su utilización está regulada por la directiva 76/768/EEC donde se indica que la concentración máxima permitida en los productos que contienen un éster es del 0,4 %, y para los que contengan mezclas de los ésteres se tolera un máximo de un 0,8 % [28].

En nuestro grupo de investigación se ha estudiado previamente la separación de la mezcla de los cuatro parabenos en diversos tipos de cosméticos [29], así como en mezclas con antioxidantes y edulcorantes en cosméticos y alimentos [30]. En ambos casos se utilizó un sistema cromatográfico de baja presión basado en una columna monolítica y detección espectrofotométrica. En este capítulo se pretende utilizar la detección quimioluminiscente para la determinación de parabenos con el objeto de poder incrementar la sensibilidad del método y ampliar su aplicación en el análisis de cosméticos.

2.2. Experimental

2.2.1. Productos químicos y materiales

Disoluciones patrón de $1,6 \cdot 10^{-2}$ M de metilparaben (MP) (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España, 99 %), etilparaben (EP), propilparaben (PP) y butil-

paraben (BP) -los últimos tres de Fluka, Madrid, España, 99 %- fueron preparados por pesada exacta de cada uno de los compuestos y disolución en acetonitrilo (ACN) (Panreac Química S.A, Barcelona, España, 99,9 % v/v, grado HPLC). Estas disoluciones fueron espectrofotométricamente estables, al menos durante dos meses, protegidas de la luz y guardadas en el refrigerador a 4°C. Las disoluciones de trabajo se prepararon con la correspondiente dilución con agua, manteniendo un porcentaje del 12 % (v/v) en ACN. Además, se preparó una disolución $6,57 \cdot 10^{-4}$ M que contenía una mezcla de los cuatro parabenos, conservándose en refrigerador a 4 °C para su uso posterior.

Los reactivos QL utilizados fueron: disolución 10^{-2} M de la sal sulfato de Ce(IV) y amonio dihidrato (99 %) y ácido sulfúrico 1 M, siendo ambos facilitados por Merck (Madrid, España) y 10^{-3} M de cloruro de rodamina 6G (Ro 6G) 95 % suministrada por Sigma. Todos los productos químicos empleados fueron de calidad analítica. Las disoluciones acuosas se prepararon empleando agua purificada por ósmosis inversa usando el sistema Milli-RO más Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EE.UU.).

2.2.2. Instrumentación y programas informáticos

El sistema de flujo empleado consiste en dos bombas peristálticas Gilson Minipuls-3 (Gilson, Inc., Middleton, EE.UU.) de 4 canales que trabajan a velocidad de flujo constante, junto con 2 válvulas rotatorias de volumen variable Rheodyne 5041, empleada una como válvula de inyección y otra como válvula de selección. Como accesorios se emplearon tubos PTFE (Omnifit, Cambridge, UK) de 0,8 mm d.i. y 1,6 mm d.e. y diversos conectores de diferentes diámetros.

Como elemento separativo para el sistema de flujo se utilizó una minicolumna monolítica de C₁₈ (cartucho de guarda Chromolith RP-18 con tapón de empaque) (5 mm×4,6 mm d.i.) de Merck (Darmstadt, Alemania). Las mediciones quimioluminiscentes se llevaron a cabo mediante un luminómetro de la casa comercial Camspec (Camspec Ltd., Cambridge, UK) conectado a un ordenador personal mediante una tarjeta integrada INT7 - 24 bit A/D.

Otros instrumentos utilizados fueron un espectrofotómetro de filas de diodos DAD Hewlett Packard HP-8453 (Nortwalk, CT, EE.UU.) conectado a un ordenador personal y equipado con células de flujo 138-QS de 1 mm de paso de luz; un cromatógrafo líquido Agilent de la serie 1100 con detección DAD provisto de una columna Zorbax C₈ que fue empleado para validar el método propuesto; y un pHmetro digital con un electrodo combinado de calomelanos saturado (Crison Instruments, Barcelona, España). Los programas informáticos empleados para el tratamiento de datos fueron: programa CSW32 suministrado por la casa DataApex Ltd. v 1.2.5 (2001) (Praga, República Checa) para la interpretación y tratamiento de los datos quimioluminiscentes, Statgraphics (Manugistics Inc. and Statistical Graphics Corporation, 1992, EE.UU.), ver.4.0 (1993) y Microsoft Office 2003.

2.2.3. Procedimiento

❖ *Patrones y muestras*

Se introducen muestras o patrones con concentraciones que oscilan entre 10⁻⁶ y 10⁻⁴ M en los diferentes parabenes MP, EP, PP y BP y con la misma composición que el portador A en el sistema de flujo a través de una válvula de inyec-

ción usando un bucle de 75 μl de capacidad. El flujo del portador A (12% ACN:H₂O v/v) se mantiene a una velocidad de 2,6 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ cambiándose, transcurridos 75 s, a un portador B (27% ACN:H₂O v/v) mediante la apertura de la válvula de selección (Figura 2.2). Después de que la muestra haya pasado por la minicolumna y los analitos ya estén separados, se mezcla, a través de un conector de 4 vías, con dos disoluciones para la generación de quimioluminiscencia, siendo la primera de Ce(IV) $2\cdot 10^{-2}$ M disuelto en H₂SO₄ 2 M y la segunda Ro 6G $4\cdot 10^{-4}$ M. Para transportar las disoluciones que generarán quimioluminiscencia se utiliza una segunda bomba peristáltica que opera a una velocidad de flujo de 2,5 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$. La señal analítica QL utilizada para la determinación de los parabenos corresponde a la diferencia entre el máximo de la señal QL (I_1) y la señal de fondo (I_0). La relación entre la concentración y la altura del pico se estableció mediante calibración convencional con patrones externos.

❖ *Referencia*

Se utilizó como método de referencia una adaptación del método HPLC-DAD propuesto por Borremans y col. [31]. Para ello se empleó un cromatógrafo de líquidos con una columna de sílice C₈ de 5 μm de tamaño de partícula y dimensiones 150 x 4,6 mm que trabaja en modo isocrático y utilizando como fase móvil agua/acetonitrilo/metanol/tetrahidrofurano (60/25/10/5) a un flujo constante de 1,0 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Los cromatogramas se obtienen midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 254 nm. Para obtener la función de calibración se utilizaron 5 patrones de diferente concentración de la mezcla de parabenos y 3 réplicas de cada uno utilizando la altura de pico como parámetro analítico.

❖ *Mantenimiento*

Para un correcto mantenimiento del sistema de flujo, especialmente para la minicolumna, es necesario realizar un cierto mantenimiento y preparación. Así antes de realizar el análisis se hace pasar el portador A a un flujo de $2,6 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ durante 5 minutos para acondicionar la minicolumna. Después de cada análisis, es decir, cuando la señal vuelve a la línea base, lo que ocurre a unos 150 s después de iniciado el análisis, se acondiciona nuevamente la columna con el portador A durante 30 s. Para mejorar el tiempo de vida de la minicolumna y tras ser usada, se lava primeramente durante 5 minutos con el portador A para finalmente lavar con agua durante otros 5 minutos.

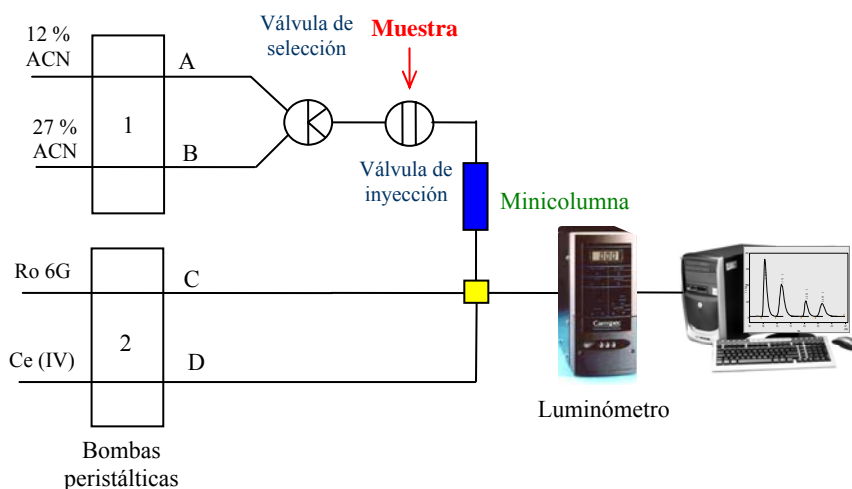


Figura 2.2 Configuración del sistema de flujo con minicolumna y detección QL.

2.2.4. Muestras

Las muestras empleadas para aplicar el método desarrollado para el análisis de parabenos consistieron en una crema limpiadora y en unas toallitas limpiadoras para el aseo personal.

La composición de la crema limpiadora era la siguiente: agua, butilenglicol, C₁₂₋₁₅ alquil benzoato, dimeticona, glucósido de cetearilo, alcohol cetiestearílico, capriloil glicina, canela (*Cinnamomum zeylanicum*), extracto de cedro (*Cedrus atlantica*), portulaga (*Portulaca oleracea*), gluconato de cinc, gluconato de cobre, alantoína, bisabolol, hexilenglicol, propilenglicol, polímeros C₁₀₋₃₀ de alquil acrilato, goma xantana, sarcosina, hidróxido sódico, fenoxietanol, metilparaben, etilparaben, propilparaben, butilparaben y fragancia.

La toallitas limpiadoras contenían humedeciendo la celulosa: agua, dimeticona, propileno, fenoxietanol, glicol, vinilacrilatos de sodio, polímeros de isodecanoato, metilparaben, EDTA disódico, etilparaben, propilparaben, olisorbato 20 y perfume.

2.2.5. Preparación de la muestras

Para el análisis de la crema limpiadora, una adecuada cantidad (generalmente 1 g) fue pesada y mezclada con 5 ml de metanol. La disolución fue introducida en un baño de ultrasonidos durante unos 10 minutos y se filtró con un filtro de jeringa de 0,45 μm [32]. Más tarde, una cantidad adecuada de esta disolución se diluyó hasta 10 ml con ACN/agua al 12%.

Para el análisis de las toallitas limpiadoras se hizo una adaptación del procedimiento propuesto por Saas y col. [33]. Una adecuada cantidad (unos 3 g) se pesó y se cortó en tiras finas para facilitar el contacto con el disolvente. Se añadieron 25 ml de ACN y se introdujeron en un baño de ultrasonidos durante 30 min a 50°C y la mezcla se filtró con un filtro de jeringa de 0,45 μm . Finalmente, la disolución se evaporó a sequedad y se disolvió el residuo en 10 ml de ACN.

Las muestras analizadas se midieron por triplicado y se utilizó la media de los valores de las alturas de pico para la adquisición de los datos.

2.3. Resultados y discusión

Los alquil hidroxibenzoatos, extensamente empleados como conservantes, son una mezcla de los cuatro primeros homólogos y para su resolución es necesario un proceso de separación. En un trabajo anterior [29] de nuestro grupo de investigación estudiamos la viabilidad de esa separación utilizando minicolumnas monolíticas incluidas en un sistema de flujo con detección ultravioleta. Aquí hemos combinado la capacidad separativa de estas minicolumnas con las ventajas que la quimioluminiscencia puede aportar a la detección analítica de los parabenes. Ventajas que se reflejan en términos de selectividad, escogiendo la química más adecuada para la generación de quimioluminiscencia, y sensibilidad, como es habitual en esta técnica de emisión molecular. Por ello, se estudió en primer lugar la separación cromatográfica de los parabenes usando un sistema FIA a baja presión, utilizando detección espectrofotométrica, para estudiar y optimizar en segundo lugar la detección QL considerando la influencia de las condiciones de separación sobre esta detección QL.

2.3.1. Procedimiento de separación

Como elemento separativo se eligió una minicolumna monolítica comercial Chromolith, utilizada como columna de guarda en HPLC y cuyas características son sílice C₁₈ de 5 mm de longitud y 4,6 mm de diámetro con un tamaño de partícula de 0,3-5,0 µm. El empleo de una columna monolítica de tan pequeña longitud hace posible resolver las habituales caídas de presión observadas en sistemas FIA cuando se utilizan minicolumnas rellenas convencionales, lo que impide el uso de las habituales bombas peristálticas [7]. En este caso, la caída de presión se reduce si se utilizan tubos de 0,8 mm de diámetro interno, siendo el flujo máximo alcanzado de 2,6 ml·min⁻¹.

Las principales variables que influyen en la separación son la composición del portador, compuesto habitualmente de una disolución amortiguadora para ajustar el pH y un cierto porcentaje de un disolvente orgánico para ajustar la polaridad. Como los cuatro parabenos tienen sus pK_a bastante similares (MP 8,87; EP 8,90; PP 8,87 y BP 8,79) [34], el pH no es relevante para preparar una separación de los mismos, y por esta razón no se utilizó ningún tampón. Por otro lado, no se ajustaron las condiciones de acidez que son necesarias para la que la posterior reacción QL se lleve a cabo para impedir que la hidrólisis de los parabenos tenga lugar durante la separación en la minicolumna.

De los distintos portadores que se pueden utilizar, los mejores resultados fueron obtenidos con las mezclas ACN/agua y MeOH/agua. Comparando ambos portadores, seleccionamos ACN/agua porque se necesita un menor porcentaje de ACN para obtener los mismos resultados que los obtenidos con la mezcla MeOH/agua, reduciendo así el vertido de disolventes orgánicos al medio am-

biente. El comportamiento de los parabenes en la minicolumna está acorde con su polaridad, esto es $MP < EP < PP < BP$, siendo el BP el más apolar. Se observa que cuantos más grupos metileno tiene la molécula, mayor es el tiempo de retención, tal como indica la Figura 2.3. La representación de los resultados, como el ancho de banda y tiempo de retención se mostrarán a lo largo del Capítulo de una manera más intuitiva mediante un diagrama de barras donde las barras de error horizontales indican el ancho de banda.

Adicionalmente, si se considera el efecto de ambos disolventes sobre la quimio-luminiscencia, se observa en ambos casos un decrecimiento en la emisión QL. Así, un 20% de MeOH supone un decrecimiento del 34,7% y un 15% de ACN supone una reducción del 5,3%, siendo el efecto similar al observado por Santiago y col.[35]. Este hecho confirma la elección de ACN/agua como portador en esta separación.

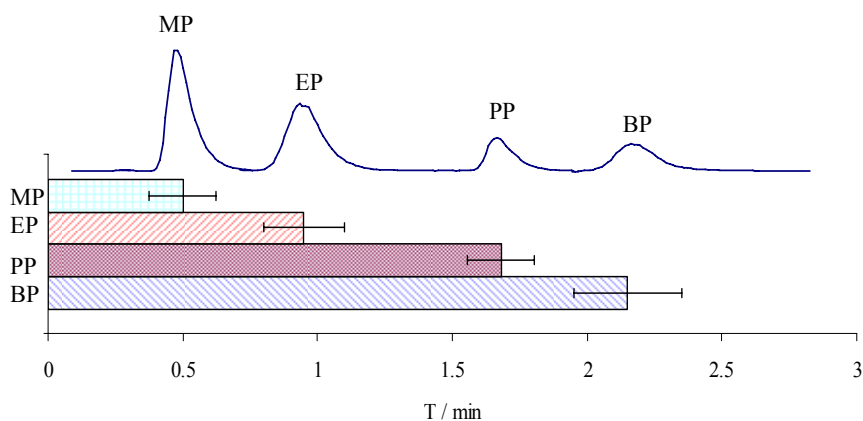


Figura 2.3 Representación de los resultados mediante diagramas de barras.

Como se muestra en la Figura 2.4.(a) la resolución de los cuatro parabenes es posible llevarla a cabo en la minicolumna si se trabaja en modo isocrático. Considerando la resolución de los analitos podemos elegir como portador un 18 % de ACN/agua, aunque el tiempo de análisis necesario es demasiado alto, de unos 600 s. Sin embargo la elección de un 12 % produce una mejora en la sensibilidad QL pero un mayor tiempo de análisis (1400 s).

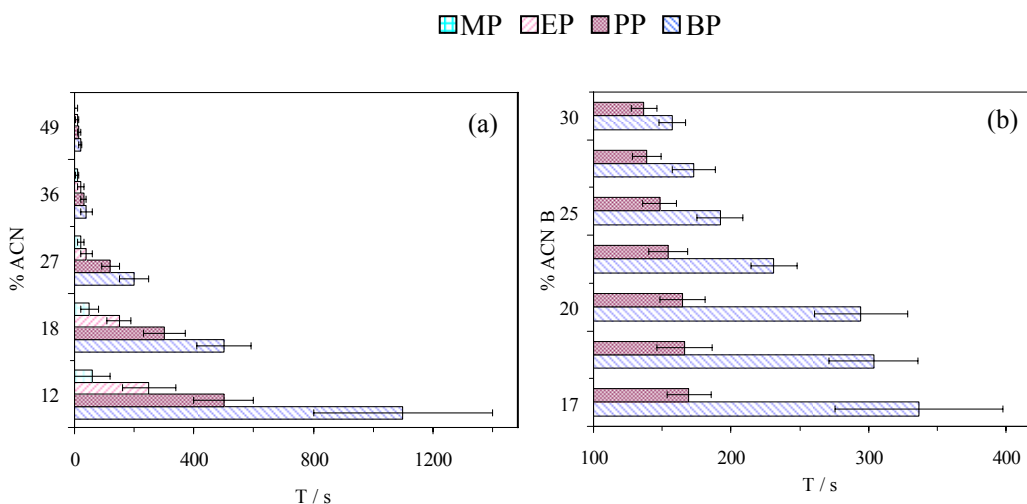


Figura 2.4 (a) Dependencia del porcentaje de ACN con respecto al tiempo de retención para los diferentes parabenos (cada valor es la media de tres medidas). Condiciones: portador: ACN/agua. Patrones $12,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$; velocidad de flujo: $1,4 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$; volumen del bucle: $150 \mu\text{l}$. (b) Dependencia de la composición del portador B con el tiempo de retención. Condiciones: Portador A: 12 % ACN/agua, portador B: ACN/agua. Velocidad de flujo: $2,6 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$; Patrones, $12,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$; volumen del bucle: $150 \mu\text{l}$. Las barras representan el tiempo de retención de los parabenos y las líneas horizontales (barras de error) son la anchura de los picos.

Una de las soluciones que se intentaron fue el incrementar la velocidad de flujo, pero incluso trabajando al flujo más alto posible ($2,6 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$) el tiempo de análisis resultaba aún demasiado alto (500 s al 12 % de ACN) debido al alto

tiempo de retención que presentaban los dos últimos parabenos PP y BP. Por consiguiente, se seleccionó esta velocidad de flujo $2,6 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ y se estudió como minimizar el tiempo de análisis modificando la polaridad del portador una vez que el MP y EP fueran eluidos. Para ello se cambió el portador A por otro portador B y se optimizó su concentración siendo las condiciones óptimas un 27 % ACN/agua, como puede verse en la Figura 2.4.(b).

El empleo consecutivo de estos dos portadores permite obtener una buena resolución entre todos los picos ($R_s > 1,2$) y un razonable tiempo de análisis (150 s). Con el portador A, ACN/agua al 12 %, separamos MP y EP, y con el portador B, ACN/agua al 27 %, separamos PP y BP. En estas condiciones, los tiempos de retención para los cuatro parabenos son: 29 s MP, 65 s EP, 104 s PP y 125 s BP.

2.3.2. Optimización de la detección QL

La optimización de las condiciones QL fueron estudiadas independientemente y de forma univariante para cada paraben, obteniendo al final valores de compromiso para todos ellos. La configuración del sistema FIA empleado es diferente a la que se propone en bibliografía [23,36], sobre todo en la disposición de la disolución portadora que mueve los analitos. Generalmente en bibliografía suele incluirse además el fluoróforo de la reacción QL, en nuestro caso Rodamina 6G. Sin embargo esta configuración contribuye a la saturación de la minicolumna. Por esta razón se utilizaron diferentes líneas de flujo tanto para los reactivos quimioluminiscentes como para los parabenos ya separados.

❖ *Velocidad del flujo total*

Como puede observarse en la Figura 2.2, utilizamos dos bombas peristálticas para las dos etapas de que consta el sistema: la separación y la detección. Como la velocidad de flujo de la bomba utilizada para la separación se fijó en $2,6 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, se estudió la dependencia de la emisión QL respecto del flujo total, ajustando para ello la velocidad de flujo que proporciona la segunda bomba peristáltica.

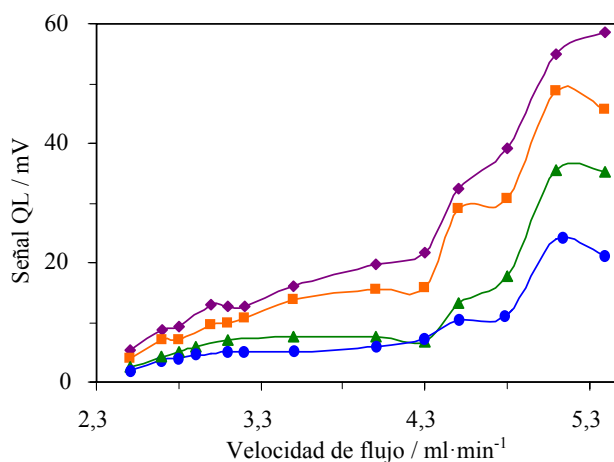


Figura 2.5 Variación de la señal QL con el flujo. Condiciones: $\text{Ce(IV)} 10^{-2} \text{ M}$; $\text{Ro } 6\text{G } 10^{-4} \text{ M}$; patrones $2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (♦ MP, ■ EP, ▲ PP, ● BP). El eje x muestra el flujo total compuesto por las dos bombas peristálticas del sistema.

La Figura 2.5 muestra que la emisión QL se incrementa conforme aumentamos la velocidad del flujo total hasta alcanzar un máximo a $5,1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, debido a que esta se va produciendo cada vez más cerca de la célula de flujo. A altas velocidades (mayores que $5,1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$) decrece la señal ya que el punto máxi-

mo de la emisión se desplaza alejándose de la célula de flujo. Así que se seleccionó $2,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ para la segunda bomba peristáltica.

❖ *Concentración de H_2SO_4*

La detección, que involucra la reacción de Ce(IV) y diferentes fluoróforos como Ro 6G, requiere condiciones fuertemente ácidas que provienen en este caso del H_2SO_4 empleado para la preparación de la disolución de Ce(IV). La Figura 2.6 muestra un máximo de emisión para todos los parabenes a una concentración 2 M de H_2SO_4 .

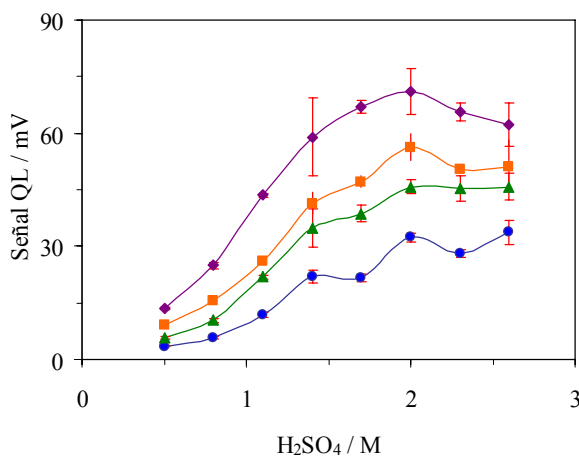


Figura 2.6 Variación de la señal QL con respecto a la concentración de H_2SO_4 . Condiciones: Ce(IV) 10^{-2} M ; Ro 6G 10^{-4} M ; volumen del bucle: $50 \mu\text{l}$; patrones $2 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ (◆ MP, ■ EP, ▲ PP, ● BP). Las barras verticales representan la repetibilidad para cada señal QL (tres réplicas por punto).

Este comportamiento es debido a que cuanto mayor sea la concentración de ácido sulfúrico, mayor es la velocidad de hidrólisis de los parabenos, y por tan-

to, mayor es la señal QL emitida, explicación que se discutirá con más detalle cuando se trate del mecanismo [23] (Sección 2.3.3).

❖ *Volumen del bucle*

Estudiamos bucles de diferentes longitudes, y por consiguiente de diferentes volúmenes, de 20 a 150 μl , para la introducción de la mezcla de parabenos. Como es habitual en FIA, se observa que la anchura del pico se incrementa con el volumen inyectado, reduciéndose así la resolución a altos volúmenes. La Figura 2.7 muestra un pequeño incremento de la señal QL al aumentar el volumen del bucle. Cuando éste se incrementa de 20 a 150 μl los parámetros cromatográficos también lo hacen, al igual que el tiempo de análisis que se incrementa en un 14,3 %, manteniéndose la resolución a valores constantes (R_s : 3,1-3,5) tal como indica la Tabla 2.1.

Tabla 2.1 Incremento producido (%) sobre los parámetros cromatográficos al aumentar el volumen del bucle de 20 a 150 μl .

Parámetro	MP	EP	PP	BP
Tiempo retención %	13,1	13,5	15,0	13,3
Altura %	100,8	97,0	89,3	119,6
Área %	135,8	123,3	99,1	106,9
Ancho de banda %	30,8	4,8	9,1	20,0

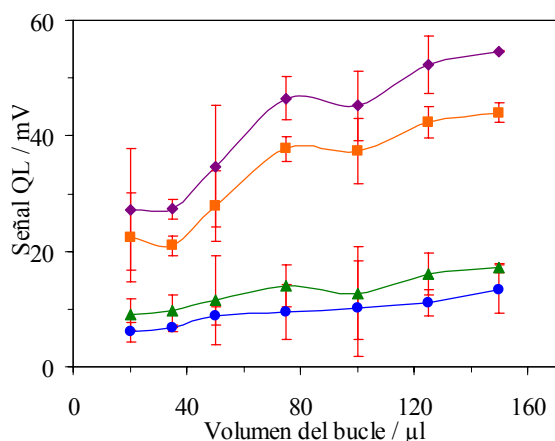


Figura 2.7 Variación de la señal QL con respecto al volumen del bucle utilizado. Condiciones: Ce(IV) 10^{-2} M; Ro 6G 10^{-4} M; H_2SO_4 2 M; patrones $2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (♦ MP, ■ EP, ▲ PP, ● BP).

Volúmenes mayores que $150 \mu\text{l}$ dan como resultado un fuerte solapamiento ($R_s < 0,5$), por lo que se seleccionó como óptimo un volumen de $75 \mu\text{l}$ como compromiso entre la señal analítica, tiempo de análisis y anchura de la banda.

❖ *Concentración de Cerio(IV)*

También se examinó el efecto de la concentración de Ce(IV) sobre la intensidad de QL. Se estudiaron diferentes concentraciones entre $6\cdot 10^{-3}$ M y $6\cdot 10^{-2}$ M obteniendo la mejor señal a una concentración de $2\cdot 10^{-2}$ M (Figura 2.8).

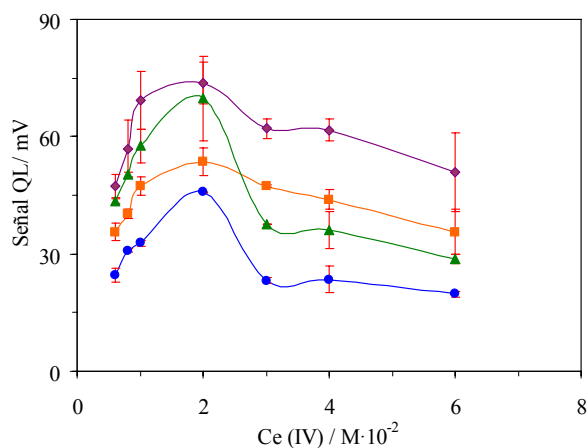


Figura 2.8 Variación de la señal QL con respecto a la concentración de Ce(IV). Condiciones: Ro $6G \cdot 10^{-4}$ M; H_2SO_4 2 M; volumen bucle $75 \mu l$; patrones $2 \text{ mg} \cdot l^{-1}$ (◆ MP, ■ EP, ▲ PP, ● BP).

El decrecimiento de la señal a altas concentraciones de Ce(IV) ha sido descrito en bibliografía y puede ser debido a dos causas: 1) una absorción de la radiación QL por exceso de Ce(IV) que hace que la disolución sea de un color amarillo intenso [23] ó 2) que el máximo del transcurso de la reacción ocurra antes de que la disolución llegue a la célula de flujo del luminómetro porque la velocidad de la reacción se incrementa con la concentración de Ce(IV) [19]. Para dilucidar la causa de este comportamiento, se realizó un experimento indirecto utilizando para ello un nuevo esquema FIA (Figura 2.9).

Este nuevo esquema FIA no contiene la minicolumna. Simplemente consiste en dos disoluciones, Ce(IV) y Rodamina 6G, teniendo esta última doble función: ser disolución portadora de los analitos y originar la señal QL.

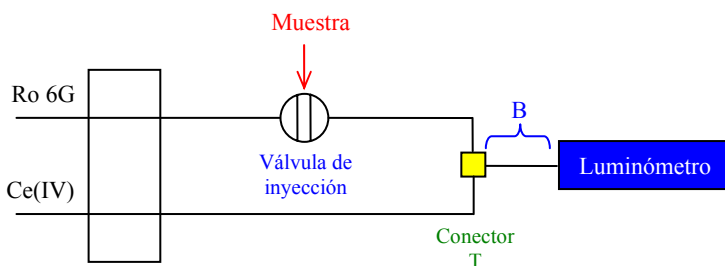


Figura 2.9 Sistema FIA utilizado para justificar el efecto de la concentración de Ce(IV).

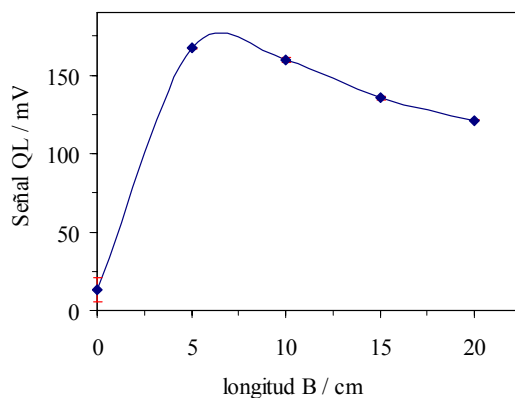


Figura 2.10 Efecto de la longitud B de la configuración FIA de la Figura 2.9. Condiciones: Ro 6G $4 \cdot 10^{-4}$ M; H_2SO_4 2 M; Ce(IV) $2 \cdot 10^{-2}$ M; volumen del bucle 75 μ l; patrón MP $2 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ y velocidad de flujo $2,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.

Se observa que un incremento de la distancia B (> 5 cm) disminuye la señal QL (Figura 2.10), debido a que el máximo de la emisión QL ocurre entonces en el interior del tubo, antes de alcanzar la cubeta de flujo, ya que al incrementar la longitud del mismo, el efecto es similar a incrementar la concentración de Ce(IV), confirmando en consecuencia la hipótesis de Yuming Huang y col. [19].

❖ *Concentración de Rodamina 6G*

Se prepararon disoluciones acuosas de Ro 6G, comprendidas entre 10^{-4} y $8 \cdot 10^{-4}$ M, modificándose la señal QL tal como indica la Figura 2.11. Se seleccionó como concentración de trabajo óptima $4 \cdot 10^{-4}$ M por su mejor repetibilidad.

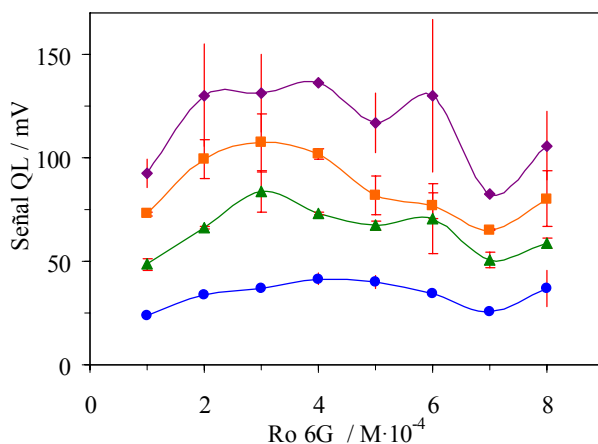


Figura 2.11 Variación de la señal QL con respecto a la concentración de Ro 6G. Condiciones: Ce(IV) $2 \cdot 10^{-2}$ M; H₂SO₄ 2 M; volumen bucle: 75 μ l; patrones $2 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ (♦ MP, ■ EP, ▲ PP, ● BP).

Cuando la concentración de Ro 6G se incrementa, la emisión QL disminuye lentamente debido a la formación de dímeros no fluorescentes de Ro 6G que actúan como atenuadores de la emisión del monómero [37].

❖ *Fuerza iónica*

La fuerza iónica se estudió añadiendo diferentes cantidades de NaCl al portador (hasta una concentración de 0,25 M), no observándose, como se debería esperar para este tipo de analitos, ninguna influencia sobre los tiempos de retención, aunque sí se observan ciertas variaciones en la altura de los picos (para MP, PP y BP hay incrementos del 2,1 %, 7,6 % y 7,6 %, respectivamente, y para EP disminuciones del orden del 5,1 %). Por lo tanto, no fue necesario adicionar sales a las disoluciones portadoras.

2.3.3. Mecanismo de la Quimioluminiscencia

El mecanismo de la reacción de Ce(IV)-Ro 6G ha sido estudiado en profundidad en la bibliografía [19,36,38,39] y su mecanismo de reacción con los parabenos ha sido discutido por Zhang y col. [32] y Hua Cui y col. [23]. En este apartado discutiremos el mecanismo y ofrecemos datos adicionales que lo confirman y completan.

Cuando el Ce(IV) reacciona con Ro 6G, ocurre una pequeña emisión quimioluminiscente, como puede verse por el pequeño pico que aparece al principio del registro de la Figura 2.13. Esta emisión es debida a la reacción redox siguiente:



La Ro 6G_{ox} no es fluorescente [40] y el Ce(III) se encuentra en su estado excitado. Este Ce(III)* puede volver a su estado fundamental teniendo a su vez una pequeña emisión QL, pero en presencia del fluoróforo Ro 6G le transfiere su energía emitiendo más quimioluminiscencia [36]:



La presencia de un compuesto fenólico en esta reacción redox, como es el caso de los parabenos, incrementa fuertemente la emisión QL. Para los parabenos se ha propuesto que la reacción QL es debida al ácido p-hidroxibenzoico (PHBA) generado por hidrólisis ácida:



donde RH es el alcohol correspondiente. El mecanismo de esta reacción es el siguiente, como muestra la figura 2.12:

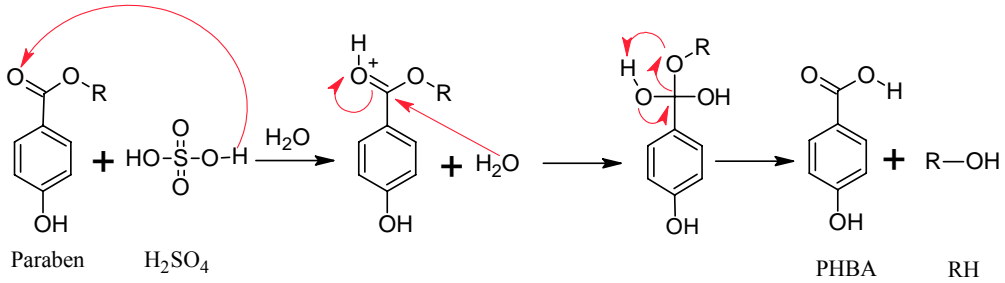


Figura 2.12 Mecanismo de la hidrólisis ácida de los parabenes [41].

Este PHBA es fácilmente oxidado por Ce(IV) produciendo Ce(III)*, como experimentalmente han observado Hua Cui y col. [23] dando los correspondientes productos de oxidación que consisten en el ácido 3,4-dihidroxibenzoico, la 1,4-hidroquinona y la 1,4-benzoquinona, aquí llamados PHBA_{ox} [42]:



Este Ce(III)* en presencia de Ro 6G puede llegar a dar una mayor y mas intensa emisión debido a la mayor producción de Ce(III)* por parte del PHBA que de la Ro 6G [18].

De hecho, observamos que el PHBA origina la emisión QL, sin embargo al probar con distintos parabenes a la misma concentración (Figura 2.13) se observa que las señales se producen con diferente intensidad.

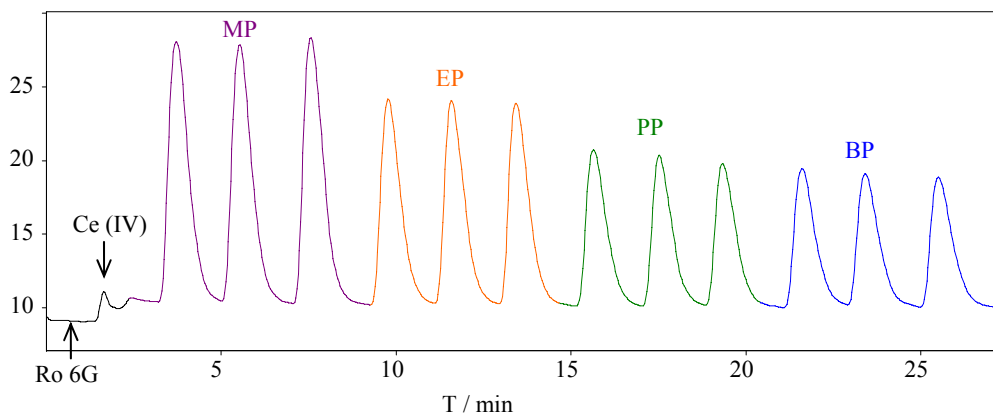


Figura 2.13 Registro de los 4 parabenes ($1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) inyectados por separado. Condiciones: $2\cdot 10^{-2} \text{ M Ce(IV)}$; $4\cdot 10^{-4} \text{ Ro 6G}$; $\text{H}_2\text{SO}_4 \text{ 2 M}$; volumen bucle: $75 \mu\text{l}$; velocidad de flujo $2,5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$.

Este resultado aparentemente contradictorio puede ser debido a la diferente velocidad de hidrólisis que experimenta cada paraben. Un incremento de la cadena alquílica en los paraben incrementa la resistencia a la hidrólisis [24]. Si consideramos la constante básica pK_b del grupo saliente (29,5 para el grupo metilo, 29,9 etilo, 30,2 propilo y 30,5 butilo) [41] esta se incrementa al aumentar la cadena de carbonos, dificultando la salida de la cadena alquílica de la molécula y disminuyendo la señal QL; datos que concuerdan con los resultados de la hidrólisis enzimática de paraben realizada por Valkova y col. [43] ya que las V_{max} que obtienen, en $\text{mM}\cdot\text{min}^{-1}$, corroboran nuestros resultados: 0,15 para MP; 0,078 PP y 0,031 BP. Por tanto, cada pico de la Figura 2.13 corres-

ponde al mismo PHBA que proviene de un paraben distinto por ser diferente la velocidad de hidrólisis.

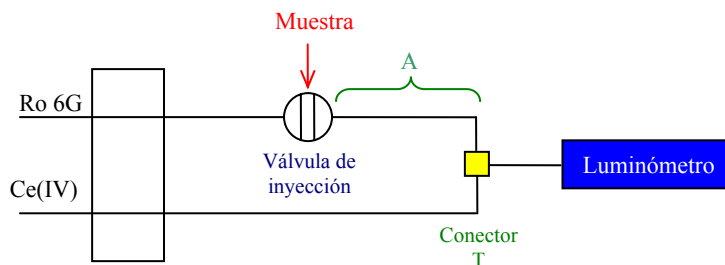


Figura 2.14 Sistema FIA utilizado para explicar el mecanismo de reacción.

El mecanismo sugiere entonces que cuanto mayor sea la cantidad de PHBA, mayor será la emisión. Así, sería posible concebir un esquema FIA en el que se mezclaran previamente los parabenes separados con Ce(IV) en H_2SO_4 para posteriormente juntarse con un flujo de Ro 6G, sin embargo este esquema no da resultados satisfactorios debido al corto tiempo de vida (milisegundos) del Ce(III)* producido.

Para apoyar el anterior mecanismo que supone que las ecuaciones 1 a 4 ocurren simultáneamente, pero en diferente extensión, se ha hecho uso del esquema FIA presentado previamente (Figura 2.14) para separar la mezcla de los reactivos. Si el Ce(IV) es mezclado primero con los parabenes, ocurre una fuerte hidrólisis y por tanto más emisión QL. Este fenómeno podemos observarlo si nos fijamos en la distancia A de la Figura 2.14.

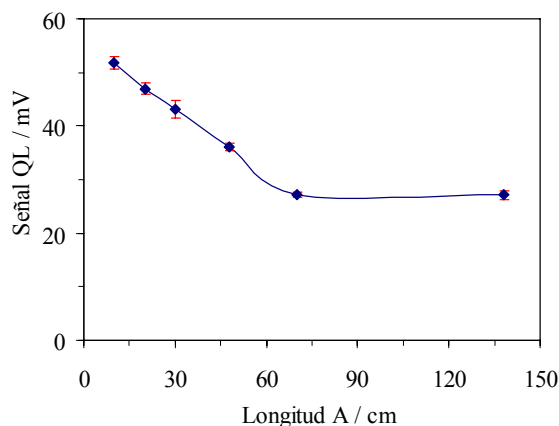


Figura 2.15 Experimento destinado a explicar la simultaneidad de las reacciones a partir de la configuración FIA de la Figura 5.14. Condiciones: $4 \cdot 10^{-4}$ M Ro 6G; H_2SO_4 2 M; $2 \cdot 10^{-2}$ M Ce(IV); volumen del bucle 75 μl ; patron MP 2 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ y velocidad de flujo $2,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.

Una longitud corta de este tubo permite solamente una buena mezcla de Ce(IV) con parabenes, ya que a esta longitud (15 cm) no hay tiempo para completar la mezcla de Ro 6G con el paraben (Figura 2.15). Al aumentar la distancia del tubo (distancia > 60 cm) podemos afirmar que todos los reactivos se mezclan bien, obteniéndose una menor emisión QL debido a la realización simultánea de las 4 reacciones anteriores (ec. 1-4), habiendo una menor producción de Ce(III)* por superposición de la reacción con Ro 6G (ec. 1) lo que disminuye el rendimiento de la reacción del Ce(IV) con PHBA.

Sin embargo, una cuestión permanece sin responder, la intensa emisión QL que ocurre a baja concentración de Ro 6G presente, es decir, a cortas longitudes del tubo A. Esto es justificable ya que la Ro 6G experimenta una fuerte retención en materiales como el vidrio o el cuarzo, en nuestro caso la celda de flujo, produciéndose así una intensa emisión.

2.3.4. Parámetros Analíticos

Las funciones de calibración para cada paraben se obtuvieron a partir de 8 patrones (Figura 2.16) con 3 réplicas para cada uno dando lugar a una función lineal para los cinco primeros patrones de la forma: $I = a \cdot X + b$.

En la Tabla 2.2 podemos ver los distintos parámetros analíticos obtenidos para esta determinación de parabenos. El límite de detección (LD) ($K = 3$) y el límite de cuantificación (LQ) ($K = 10$) se establecieron acorde con las directrices de la IUPAC, utilizando la desviación estándar del blanco como señal de fondo [44]. Además en la tabla se presentan las desviaciones estándar relativas (DER) a dos concentraciones de los parabenos, $0,15 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ y $15 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$.

La frecuencia de muestreo resultante es de aproximadamente de 20 h^{-1} . El método propuesto muestra resultados satisfactorios para la cuantificación de cada paraben en presencia de parabenos coexistentes.

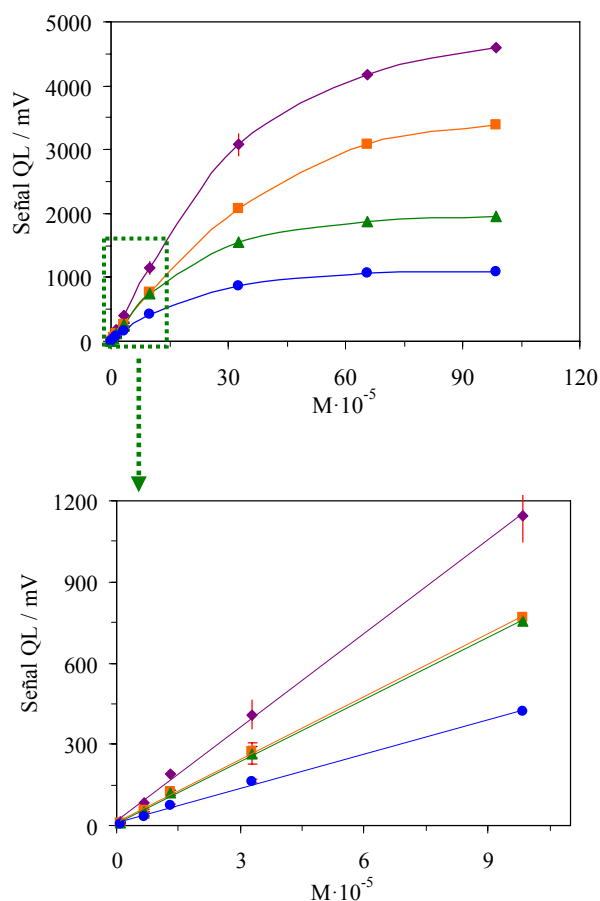


Figura 2.16 Calibración lineal a partir de los 8 patrones de los 4 parabenos (♦ MP, ■ EP, ▲ PP, ● BP).

Además de la Tabla 2.2 se deduce que el empleo del área del pico como parámetro analítico presenta mayor sensibilidad pero menor repetibilidad que la altura de pico. Por esta razón se eligió la altura del pico para las aplicaciones analíticas, como es habitual en los métodos quimioluminiscentes.

Tabla 2.2 Parámetros analíticos para la determinación de MP, EP, PP y BP.

Parámetro	MP		EP		PP		BP	
	Altura	Área	Altura	Área	Altura	Área	Altura	Área
b	76,64	479,25	49,00	473,70	7,96	443,77	11,46	68,04
S_b	25,77	129,55	17,51	135,60	6,04	199,81	3,74	39,32
a/M⁻¹	9,28·10 ⁶	1,04·10 ⁸	6,26·10 ⁶	1,00·10 ⁸	7,61·10 ⁶	6,17·10 ⁷	4,19·10 ⁶	7,21·10 ⁷
S_a/M⁻¹	1,83·10 ⁵	9,21·10 ⁵	1,24·10 ⁵	9,64·10 ⁵	1,28·10 ⁵	1,42·10 ⁶	7,98·10 ⁴	8,37·10 ⁵
R²/%	99,38	99,87	99,37	99,85	99,63	99,16	99,53	99,82
RDL/M	9,85·10 ⁻⁷	9,85·10 ⁻⁷	9,02·10 ⁻⁷	9,02·10 ⁻⁷	8,32·10 ⁻⁷	8,32·10 ⁻⁷	7,72·10 ⁻⁷	7,72·10 ⁻⁷
	a 3,28·10 ⁻⁴	a 3,28·10 ⁻⁴	a 3,28·10 ⁻⁴	a 3,28·10 ⁻⁴	a 9,86·10 ⁻⁵	a 9,86·10 ⁻⁵	a 9,86·10 ⁻⁵	a 9,86·10 ⁻⁵
LD/M	1,91·10 ⁻⁸	9,19·10 ⁻⁹	2,83·10 ⁻⁸	9,56·10 ⁻⁹	2,33·10 ⁻⁸	1,55·10 ⁻⁸	4,22·10 ⁻⁸	1,33·10 ⁻⁸
LQ/M	6,36·10 ⁻⁸	3,06·10 ⁻⁸	9,43·10 ⁻⁸	3,19·10 ⁻⁸	7,75·10 ⁻⁸	5,17·10 ⁻⁸	1,41·10 ⁻⁷	4,42·10 ⁻⁸
DER[*]/%	5,56	4,19	3,49	5,38	4,22	8,70	6,22	9,25
DER^{**}/%	2,85	3,78	4,28	2,30	5,17	5,44	3,65	5,33

b pendiente; S_b desviación estándar de la pendiente; a ordenada; S_a desviación estándar de la ordenada; R coeficiente de correlación; RDL rango dinámico lineal; LD límite de detección; LQ límite de cuantificación; DER^{*} desviación estándar relativa para una concentración de 0,15 mg·l⁻¹ (baja concentración) de parabenos; DER^{**} desviación estándar relativa para una concentración de 15 mg·l⁻¹ de parabenos (alta concentración).

Comparando las características analíticas de los diferentes métodos de determinación de parabenos encontrados en la bibliografía (Tabla 2.3), observamos que el método que usa HPLC muestra un mayor rango lineal comparado con las técnicas de flujo a baja presión y la electroforesis capilar. Además, el uso de la detección QL mejora en general el LD (unas diez veces menos) y la repetibilidad e incrementa el rango lineal un orden de magnitud. Por lo tanto, el acoplamiento de la detección quimioluminiscente a técnicas separativas mejora en varios aspectos la determinación analítica de los parabenos.

2.3.5. Aplicaciones analíticas

El método propuesto fue aplicado a la determinación de parabenos en cosméticos (toallitas y crema limpiadoras). Una de ellas contiene solamente tres parabenos (toallitas limpiadoras) y la otra contiene los cuatro (crema limpiadora).

Tabla 2.3 Comparación de la determinación de una mezcla de parabenos en muestras con diferentes técnicas analíticas.

Método	Comp.	Rango (M)	LD (M)	Precisión (%)	Aplicación	Ref.
Electroforesis Detección DAD	MP	$3,01 \cdot 10^{-6} - 4,89 \cdot 10^{-5}$	$2,14 \cdot 10^{-6}$	1,9	Cosméticos	[45]
	EP	$3,51 \cdot 10^{-6} - 5,69 \cdot 10^{-5}$	$1,75 \cdot 10^{-6}$	1,3		
	PP	$3,33 \cdot 10^{-6} - 5,41 \cdot 10^{-5}$	$1,42 \cdot 10^{-6}$	1,2		
	BP	$3,60 \cdot 10^{-6} - 5,84 \cdot 10^{-5}$	$2,86 \cdot 10^{-6}$	1,3		
HPLC Detección DAD	MP	$6,57 \cdot 10^{-6} - 2,63 \cdot 10^{-4}$	$1,31 \cdot 10^{-7}$	1,5	Cosméticos	[46]
	EP	$6,01 \cdot 10^{-6} - 2,40 \cdot 10^{-4}$	$1,80 \cdot 10^{-7}$	3,2		
	PP	$5,55 \cdot 10^{-6} - 2,21 \cdot 10^{-4}$	$1,66 \cdot 10^{-7}$	2,5		
	BP	$5,14 \cdot 10^{-6} - 2,05 \cdot 10^{-4}$	$1,54 \cdot 10^{-7}$	2,4		
Minicolumna FIA Detección DAD	MP	$3,17 \cdot 10^{-5} - 8,23 \cdot 10^{-4}$	$3,17 \cdot 10^{-5}$	1,4	Cosméticos	[29]
	EP	$3,84 \cdot 10^{-5} - 6,58 \cdot 10^{-4}$	$1,15 \cdot 10^{-5}$	2,7		
	PP	$5,77 \cdot 10^{-5} - 1,07 \cdot 10^{-3}$	$1,73 \cdot 10^{-5}$	2,6		
	BP	$1,12 \cdot 10^{-4} - 1,97 \cdot 10^{-3}$	$3,37 \cdot 10^{-5}$	3,5		
FIA (sin separación) Detección QL	MP	$2,95 \cdot 10^{-9} - 9,85 \cdot 10^{-7}$	$2,23 \cdot 10^{-9}$	1,1	Alimentos	[23]
	EP	$1,81 \cdot 10^{-8} - 3,0 \cdot 10^{-6}$	$1,20 \cdot 10^{-8}$	1,2		
	PP	$2,77 \cdot 10^{-8} - 5,55 \cdot 10^{-6}$	$1,11 \cdot 10^{-8}$	1,6		
	BP	$4,12 \cdot 10^{-8} - 4,12 \cdot 10^{-6}$	$2,57 \cdot 10^{-8}$	1,7		
HPLC Detección QL	MP	$2,62 \cdot 10^{-8} - 4,6 \cdot 10^{-5}$	$1,24 \cdot 10^{-8}$	2,6	Cosméticos	[32]
	EP	$3,00 \cdot 10^{-8} - 5,41 \cdot 10^{-5}$	$1,62 \cdot 10^{-8}$	2,2		
	PP	$3,32 \cdot 10^{-8} - 5,54 \cdot 10^{-5}$	$2,16 \cdot 10^{-8}$	1,9		
	BP	$3,08 \cdot 10^{-8} - 5,14 \cdot 10^{-5}$	$2,72 \cdot 10^{-8}$	1,7		
Minicolumna FIA Detección QL	MP	$9,85 \cdot 10^{-7} - 3,28 \cdot 10^{-4}$	$1,91 \cdot 10^{-8}$	5,6	Cosméticos	Esta Tesis
	EP	$9,02 \cdot 10^{-7} - 3,28 \cdot 10^{-4}$	$2,83 \cdot 10^{-8}$	3,5		
	PP	$8,32 \cdot 10^{-7} - 9,86 \cdot 10^{-5}$	$2,33 \cdot 10^{-8}$	4,2		
	BP	$7,72 \cdot 10^{-7} - 9,86 \cdot 10^{-5}$	$4,22 \cdot 10^{-8}$	6,2		

Para la extracción de los parabenos en los cosméticos, se hizo una adaptación del procedimiento basado en ACN propuesto por Saas y col. [33] para las toallitas limpiadoras y el basado en MeOH para la crema limpiadora [32]. Los procedimientos de extracción se comprobaron realizando adiciones de cantidades conocidas de cada paraben. Las recuperaciones obtenidas de los diferentes parabenos (Tabla 2.4) presentan valores comprendidos entre 92,0 y 111,4 %.

Tabla 2.4 Resultados del estudio de recuperación para una mezcla de parabenos en cosméticos.

Compuestos	Muestras			
	Crema limpiadora		Toallitas limpiadoras	
	Nivel de adición mg·g ⁻¹	Recuperación ^a %	Nivel de adición mg·g ⁻¹	Recuperación ^a %
MP	0,22	111 ± 8	1,56	107 ± 3
EP	0,34	92 ± 9	0,48	83 ± 3
PP	0,20	105 ± 7	0,45	100 ± 4
BP	0,18	99 ± 4	---	---

^a Los valores son una media de tres determinaciones ± desviación estándar.

Un ejemplo de los registros que se obtienen para las distintas muestras puede verse en la Figura 2.17.

En la tabla 2.5 se demuestra que el método quimioluminiscente se puede validar con respecto al método de referencia HPLC [31]. Esta tabla incluye la media de los valores para 3 determinaciones de las muestras, sus desviaciones estándar y el valor de probabilidad (valor P) de comparación de ambos métodos.

El método propuesto presenta varias ventajas respecto al método HPLC, así su uso es más simple, rápido, económico y además presenta buenos límites de detección. Los inconvenientes de la metodología empleada son los concernientes a su menor precisión y a la limitada capacidad de separación de la columna debido a su pequeña longitud, aunque es suficiente para una determinación de parabenos.

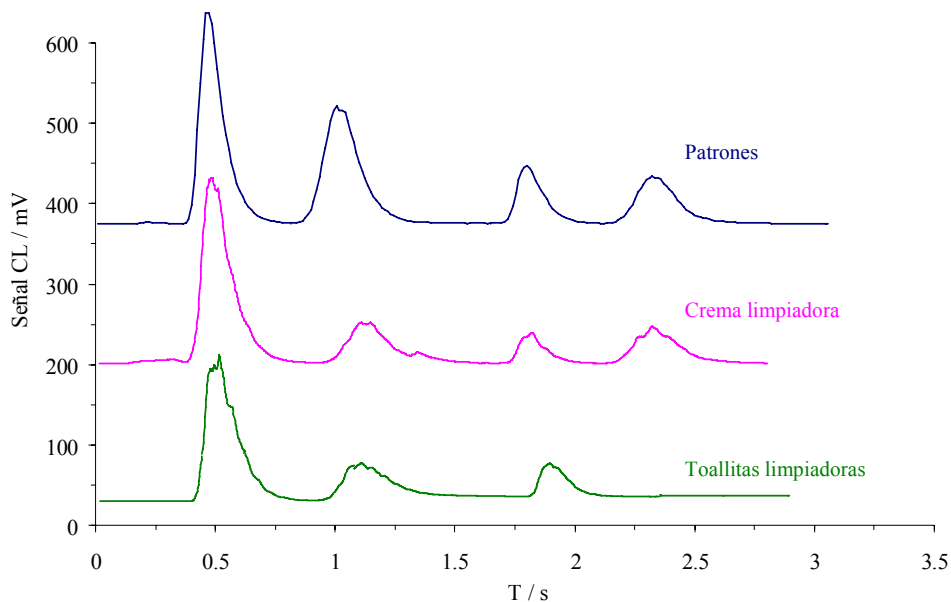


Figura 2.17 Registro de los patrones y de las distintas muestras (crema limpiadora y toallitas).

Tabla 2.5 Resultados obtenidos de una mezcla de parabenes en el método propuesto y en el de referencia.

Muestra	MP/mg·g ⁻¹ ; D.E.R. (%)			EP/mg·g ⁻¹ ; D.E.R. (%)			PP/mg·g ⁻¹ ; D.E.R. (%)			BP/mg·g ⁻¹ ; D.E.R. (%)		
	M. P.*	M. R.*	P _v [†] (%)	M. P.*	M. R.*	P _v [†] (%)	M. P.*	M. R.*	P _v [†] (%)	M. P.*	M. R.*	P _v [†] (%)
Crema limpiadora	0,64; 2,01	0,67; 0,14	5,0	0,143; 6,07	0,153; 0,47	15,5	0,213; 5,87	0,210; 0,45	68,9	0,194; 1,88	0,203; 0,51	6,7
Toallitas limpiadoras	0,730; 1,89	0,73; 1,81	97,4	0,210; 0,721	0,208; 0,32	71,9	0,20; 4,4	0,201; 0,24	5,0	---	---	---

* Valor medio de tres determinaciones ± D.E.R. Los datos vienen expresados por mg de paraben por gramo de producto.

† P_v: Valor P.

M.P. Método propuesto; M.R. Método de referencia.

2.4. Conclusiones

Se ha realizado con éxito la separación de una mezcla de cuatro parabenos MP, EP, PP y BP utilizando un sistema cromatográfico a baja presión en una columna monolítica muy corta (5 mm) mediante detección quimioluminiscente. El empleo de la detección QL mediante la reacción Ce(IV)-Rodamina 6G mejora la amplitud del rango lineal y disminuye el límite de detección en unos dos órdenes de magnitud respecto a la detección espectrofotométrica, manteniendo la precisión. La detección QL incrementa la sensibilidad del método para poder ser aplicado en el análisis de cosméticos. Los resultados fueron quimiométricamente validados comparándolos con un método de referencia de HPLC. El método descrito es práctico, simple, rápido y económico, y permite determinar parabenos a concentraciones de $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ con una precisión del 2-6 %. Este método también puede ser empleado como análisis de rutina por su corto tiempo de análisis (150 s) y por su fácil mantenimiento.

2.5. Bibliografía

1. J.L. Adcock, P.S. Francis, K.M. Agg, G.D. Marshall, N.W. Barnett, *Anal.Chim.Acta* 600 (2007) 136.
2. E. Tyrrell, P.N. Nesterenko, B. Paull, *J.Liquid Chromatog.Rel.Tech.* 29 (2006) 2201.
3. P. Chocholous, D. Satinsky, P. Solich, *Talanta* 70 (2006) 408.
4. H.M. Gonzalez-San Miguel, J.M. Alpizar-Lorenzo, V. Cerda-Martin, *Talanta* 72 (2007) 296.

5. K. Cabrera, *J.Sep.Sci.* 27 (2004) 843.
6. D. Satinsky, P. Solich, P. Chocholous, R. Karliceck, *Anal.Chim.Acta* 499 (2003) 205.
7. S. Pelletier, C.A. Lucy, *J.Chromatog.A* 1118 (2006) 12.
8. D. Satinsky, L.M.L. Dos Santos, H. Sklenarova, P. Solich, M.C. Montenegro, A.N. Araujo, *Talanta* 68 (2005) 214.
9. D. Satinsky, J. Huclova, R.L.C. Ferreira, M.C. Montenegro, P. Solich, *J.Pharm.Biomed.Anal.* 40 (2006) 287.
10. J. Klimundova, D. Satinsky, H. Sklenarova, P. Solich, *Talanta* 69 (2006) 730.
11. D. Satinsky, I. Neto, P. Solich, H. Sklenarova, M. Conceicao, B.S.M. Montenegro, A.N. Araujo, *J.Sep.Sci.* 27 (2004) 529.
12. P.N. Nesterenko, M.A. Rybalko, *Dokl.Chem.* 404 (2005) 178.
13. B. Paull, C.O. Riordain, P.N. Nesterenko, *Chem.Comm.* (2005) 215.
14. D. Connolly, D. Victory, B. Paull, *J.Sep.Sci.* 27 (2004) 912.
15. D. Victory, P. Nesterenko, B. Paull, *Analyst* 129 (2004) 700.
16. C. Dodeigne, L. Thunus, R. Lejeune, *Talanta* 51 (2000) 415.
17. Z.D. Zhang, W.R.G. Baeyens, X.R. Zhang, G. Van der Weken, *J.Pharm.Biomed.Anal.* 14 (1996) 939.
18. Y. Huang, Z. Chen, *Talanta* 57 (2002) 953.
19. W. Liu, Y. Huang, *Anal.Chim.Acta* 506 (2004) 183.
20. J.A. Murillo Pulgarin, A. Alanon Molina, G. Perez-Olivares Nieto, *Anal.Chim.Acta* 518 (2004) 37.

-
21. M. Ciborowski, M.C. Icardo, J.V.G. Mateo, J. Martinez Calatayud, *J.Pharm.Biomed.Anal.* 36 (2004) 693.
 22. J.P. Wang, N.B. Li, H.Q. Luo, *Spectrochim.Acta A* 71 (2008) 204.
 23. A. Myint, Q. Zhang, L. Liu, H. Cui, *Anal.Chim.Acta* 517 (2004) 119.
 24. M.G. Soni, I.G. Carabin, G.A. Burdock, *Food Chem.Toxicol.* 43 (2005) 985.
 25. S.H. Kang, H. Kim, *J.Pharm.Biomed.Anal.* 15 (1997) 1359.
 26. E. Nettis, M. Marcandrea, M.C. Colanardi, M.T. Paradiso, A. Ferrannini, A. Tursi, *Allergy* 58 (2003) 1304.
 27. A. Schnuch, W. Uter, J. Geier, O. Gefeller, *Contact Dermatitis* 47 (2002) 32.
 28. Scientific Committee on Consumer Products. Extended Opinion on the Safety Evaluation of Parabens. SCCP/0873/05, 1-11. 2005.
 29. J.F. Garcia-Jimenez, M.C. Valencia-Miron, L.F. Capitan-Vallvey, *J.Anal.Chem.* En prensa (2008) .
 30. J.F. Garcia-Jimenez, M.C. Valencia, L.F. Capitan-Vallvey, *Anal.Chim.Acta* 594 (2007) 226.
 31. M. Borremans, J. van Loco, P. Roos, L. Goeyens, *Chromatographia* 59 (2004) 47.
 32. Q. Zhang, M. Lian, L. Liu, H. Cui, *Anal.Chim.Acta* 537 (2005) 31.
 33. B. Saad, M. Bari, M.I. Saleh, K. Ahmad, M. Talib, *J.Chromatog.A* 1073 (2005) 393.
 34. T. Angelov, A. Vlasenko, W. Tashkov, *J.Liquid Chromatog.Rel.Tech.* 31 (2008) 188.
 35. R. Santiago Valverde, I. Sanchez Perez, F. Franceschelli, M. Martinez Galera, M.D. Gil Garcia, *J.Chromatog.A* 1167 (2007) 85.

36. H. Cui, Q. Zhang, A. Myint, X. Ge, L. Liu, *J.Photochem.Photobiol.*, A 181 (2006) 238.
37. T. Taguchi, S. Hirayama, M. Okamoto, *Chem.Phys.Lett.* 231 (1994) 561.
38. Y. Huang, Z. Chen, *Talanta* 57 (2002) 953.
39. Y. Ma, X. Jin, M. Zhou, Z. Zhang, X. Teng, H. Chen, *Anal.Chim.Acta* 489 (2003) 173.
40. S. Feng, X. Chen, G. Zhang, J. Fan, *Lihua Jianyan*, Huaxue Fence 39 (2003) 221.
41. Vollhardt, K.; Schore, N. *Organic Chemistry*, 2 ed.; Freeman and Company, New York: Barcelona, 1996.
42. C.K. Duesterberg, T.D. Waite, *Environ.Sci.Technol.* 41 (2007) 4103.
43. N. Valkova, F. Lepine, L. Labrie, M. Dupont, R. Beaudet, *J.Biol.Chem.* 278 (2003) 12779.
44. Analytical Methods Committee, *Analyst* 113 (1988) 1469.
45. U. Uysal, T. Guray, *J.Anal.Chem.* 63 (2008) 982.
46. L. Labat, E. Kummer, P. Dallet, J.P. Dubost, *J.Pharm.Biomed.Anal.* 23 (2000) 763.

Capítulo 3

***ANÁLISIS DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN
DERMOCOSMÉTICOS MEDIANTE CROMATO-
GRAFÍA LÍQUIDA A BAJA PRESIÓN Y DETEC-
CIÓN QUIMIOLUMINISCENTE.***

"Lo importante en ciencia no es tanto obtener nuevos hechos sino como descubrir nuevas formas de pensar sobre ellos"



*Williams Lawrence Bragg (1890-1971)
Premio Nobel de Física en 1915*

"Un fenómeno no es un verdadero fenómeno hasta que no es un fenómeno observado."



*John A. Wheeler (1911-2008)
Premio Wolf de Física en 1997*

CAPÍTULO 3: ANÁLISIS DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN DERMOCOSMÉTICOS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA A BAJA PRESIÓN Y DETECCIÓN QUIMIOLUMINISCENTE

3.1. Introducción

Uno de los grupos de compuestos químicos más analizados han sido los compuestos fenólicos (CFs) debido a su implicación en cuestiones relacionadas con la salud y a sus propiedades fisiológicas, químicas y anticancerígenas. Estos compuestos se producen de forma natural- en alimentos y desechos tanto de tipo humano como animal, así como en la descomposición de materia orgánica- aunque también pueden ser productos químicos fabricados por el hombre para su uso en múltiples aplicaciones [1]. Estos compuestos, caracterizados por poseer un anillo aromático con al menos un grupo hidroxilo unido, han sido abundantemente utilizados como conservantes en preparados farmacéuticos por su amplio espectro antimicrobiano. Su presencia puede resultar dañina para los consumidores debido a su tendencia a inducir dermatitis alérgica por contacto. Por lo tanto, la determinación de estos compuestos en diferentes productos comerciales tiene importancia para la certificación de la calidad así como para la seguridad del consumidor. Uno de los ámbitos comerciales en los que se pueden encontrar estos compuestos es la dermocosmética, que es una rama de la Dermatología que se ocupa del cuidado y mejora estética de la piel normal, mediante la prevención o reparación de las constantes alteraciones que pueda experimentar [2].

Las técnicas más usadas para la determinación de los compuestos fenólicos incluyen cromatografía de gases [3], cromatografía líquida de alta resolución HPLC [4,5] y electroforesis capilar [6].

La unión de la cromatografía con las técnicas de flujo ofrece interesantes características, porque las técnicas de flujo presentan ventajas en simplicidad, bajo coste, versatilidad, velocidad, y, habitualmente, buenas características analíticas, aunque no tienen capacidad separativa. Por su parte, HPLC es una técnica analítica muy potente con una alta capacidad separativa, selectividad y eficiencia, pero que requiere de una instrumentación mucho más costosa que las técnicas de flujo. Esto justifica la combinación de las técnicas de flujo, tales como el análisis de inyección de flujo (FIA) [7] ó el análisis por inyección secuencial (SIA) [8] con separaciones cromatográficas a baja presión para conseguir una metodología analítica de bajo coste.

La clave de esta combinación de técnicas de flujo con separaciones cromatográficas son los materiales monolíticos, que como hemos visto en la Introducción de esta Memoria, son polímeros monolíticos porosos con alto grado de entrecruzamiento y que presentan mesoporos para la retención de analitos y macroporos para permitir el paso del fluido que los atraviesa, facilitando así una alta capacidad de separación, estabilidad química y buenas velocidades de flujo en condiciones de baja presión [9,10].

Se han utilizado diferentes combinaciones de técnicas de flujo con materiales monolíticos usando como detector espectrofotómetros de fila de diodos (DAD) o mediante conductimetría para la separación de mezcla de fármacos [7,8,11-

13], aditivos en alimentos ó en cosméticos [14,15], contaminantes tales como los hidrocarburos aromáticos policíclicos [16] y mezclas de cationes y aniones inorgánicos [10,17-19].

La quimioluminiscencia (QL) es un método de detección ampliamente utilizado en distintas técnicas separativas tales como la HPLC, electroforesis capilar, cromatografía en capa fina y FIA [20] debido a la alta sensibilidad que presenta y al alto rango dinámico lineal alcanzable con una instrumentación simple [21]. Se han utilizado diferentes tipos de detección quimioluminiscente en esquemas FIA para la determinación de compuestos fenólicos aunque sin etapa de separación. Así, Haghghi y Dadashvand [22] han propuesto la química QL basada en N-clorosuccinimida, KI y luminol. Por su parte, Costin y col. [23] han empleado un sistema FIA con detección quimioluminiscente utilizando permanganato en condiciones ácidas para la estimación del contenido fenólico total en vinos. Cui y col. han propuesto la reacción QL entre Ce(IV) y Rodamina 6G para la determinación de diversos tipos de compuestos fenólicos de manera individual [21]. Asimismo se ha propuesto la combinación de HPLC con detección QL lo que ofrece mejoras interesantes sobre los métodos HPLC convencionales para la determinación de compuestos fenólicos [24,25].

La detección QL ha sido escasamente utilizada en sistemas de cromatografía a baja presión con columnas monolíticas. Así, Adcock y col. [7] han propuesto un sistema híbrido FIA/HPLC para la separación de seis alcaloides y cuatro aminas biogénicas utilizando una columna monolítica de 25 mm de longitud con detección QL usando tris(2,2'-bipiridil)rutenio(II) y permanganato. Por su parte, Paull y col. [26] han utilizado un disco monolítico quelante de 3 mm de longi-

tud para la retención selectiva y determinación QL de Cu(II) basada en la química de 1,10-fenantrolina y peróxido de hidrógeno.

En este capítulo estudiamos un método que emplea la detección QL en separaciones cromatográficas a baja presión, usando un sistema FIA que incluye columnas monolíticas muy pequeñas al objeto de mejorar las características de estos métodos. Para ello, hemos seleccionado una serie de compuestos fenólicos que se utilizan en dermatocósmética, tales como floroglucinol (PH), ácido 2,4-dihidroxibenzóico (DHBA), ácido salicílico (SA), metil paraben (MP) y n-propil galato (PG) (Figura 3.1) para verificar y proponer una solución analítica simple y económica de su determinación.

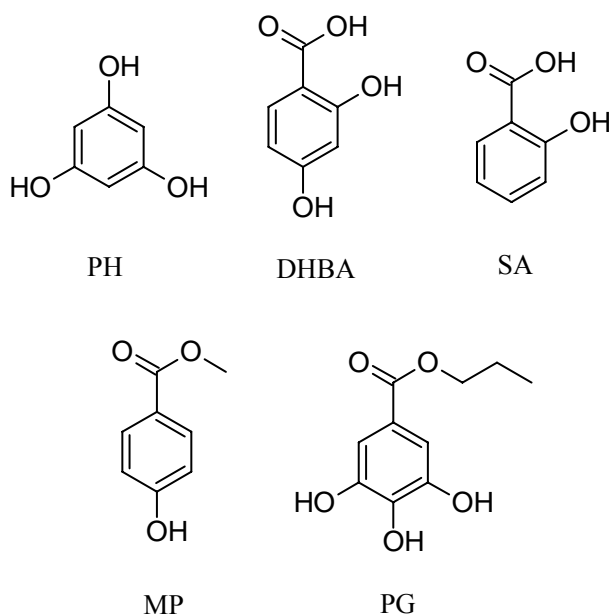


Figura 3.1 Estructura de los diferentes compuestos fenólicos ensayados.

3.2. Experimental

3.2.1. Productos químicos y materiales

Todos los productos químicos utilizados fueron de calidad analítica. Las disoluciones se prepararon utilizando agua de ósmosis inversa producida por un sistema de purificación Milli-RO 12 más Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EE.UU.). Los compuestos fenólicos floroglucinol (PH), ácido 2,4-dihidroxibenzóico (DHBA), ácido salicílico (SA), metil paraben (MP) y n-propil galato (PG) fueron suministrados por Sigma (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España). Se prepararon disoluciones madre de $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de cada compuesto fenólico (CF) y además otra disolución madre conteniendo todos ellos con una concentración de $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ en cada uno. Cada disolución se preparó por pesada exacta del patrón y disolución en acetonitrilo acuoso al 5 % (v/v) a partir de acetonitrilo (ACN) (Panreac Química S.A, Barcelona, España, 99,9 % v/v calidad HPLC). Estas disoluciones fueron espectrofotométricamente estables durante al menos dos meses protegidas de la luz y guardadas en un refrigerador a 4°C . Las demás disoluciones se prepararon por dilución apropiada con agua, manteniendo en todos los casos la proporción de ACN al 5 % (v/v).

El tampón acetato 2 M de pH 3,0 se preparó a partir de ácido acético (Panreac) del 96 % (p/v) ($d = 1,052 \text{ g}\cdot\text{ml}^{-1}$) y disolución 0,5 M de NaOH. Los reactivos quimioluminiscentes utilizados fueron: disolución de Ce(IV) 10^{-2} M a partir de sulfato de Ce(IV) y amonio dihidrato (99 %) en ácido sulfúrico 1 M, siendo ambos facilitados por Merck (Madrid, España), y rodamina 6G (Ro 6G) 10^{-3} M a partir de cloruro de rodamina 6G 95 %, suministrada por Sigma.

3.2.2. Instrumentación y programas informáticos

El sistema de flujo empleado consiste en dos bombas peristálticas Gilson Minipuls-2 (Gilson Inc., Middleton, EE.UU.) de 4 canales que trabajan a velocidad de flujo constante, junto con cuatro válvulas rotatorias de volumen variable Rheodyne 5041, una empleada como válvula de inyección y las otras tres como válvulas de selección, controladas todas ellas electromecánicamente mediante un dispositivo diseñado por nosotros [27]. Se emplearon tubos PTFE (Omnifit, Cambridge, R.U.) de 0,8 mm de diámetro interno y 1,6 mm de diámetro externo así como diversos conectores de diferentes diámetros. Como elemento separativo para el sistema de flujo se utilizó como minicolumna monolítica de C_{18} un cartucho de guarda Chromolith RP-18 con tapón de empaque de 5 mm \times 4,6 mm d.i. de Merck (Darmstadt, Alemania) y una precolumna aniónica de Bia Separations (Ljubljana, Eslovenia). Con estas columnas monolíticas se pueden usar bombas de baja presión como son las bombas peristálticas. Adicionalmente, la caída de presión del sistema se minimizó utilizando tubos de 0,8 de diámetro interno siendo el flujo máximo alcanzado de 2,6 ml·min⁻¹.

Las medidas de quimioluminiscencia se llevaron a cabo mediante un luminómetro de la casa comercial Camspec (Camspec Ltd., Cambridge, R.U.) conectado a un ordenador personal mediante una tarjeta integrada INT7 - 24 bit A/D. Las bombas peristálticas, las válvulas rotatorias y el luminómetro se conectaron a un PC y se controlaron por un programa informático desarrollado por nosotros.

Otros instrumentos utilizados fueron un espectrofotómetro de fila de diodos DAD Hewlett Packard HP-8453 (Nortwalk, CT, EE.UU.) conectado a un ordenador personal y equipado con células de flujo 138-QS de 1 mm de paso de luz; un cromatógrafo líquido Agilent de la serie 1100 con detección DAD provisto de una columna Zorbax C₈ que fue empleado para validar el método propuesto y un pH-metro digital con un electrodo combinado de calomelanos saturado (Crison Instruments, Barcelona, España). Para la extracción de las muestras se utilizaron cartuchos de extracción en fase sólida C₁₈ (Biotage AB, Uppsala, Suecia).

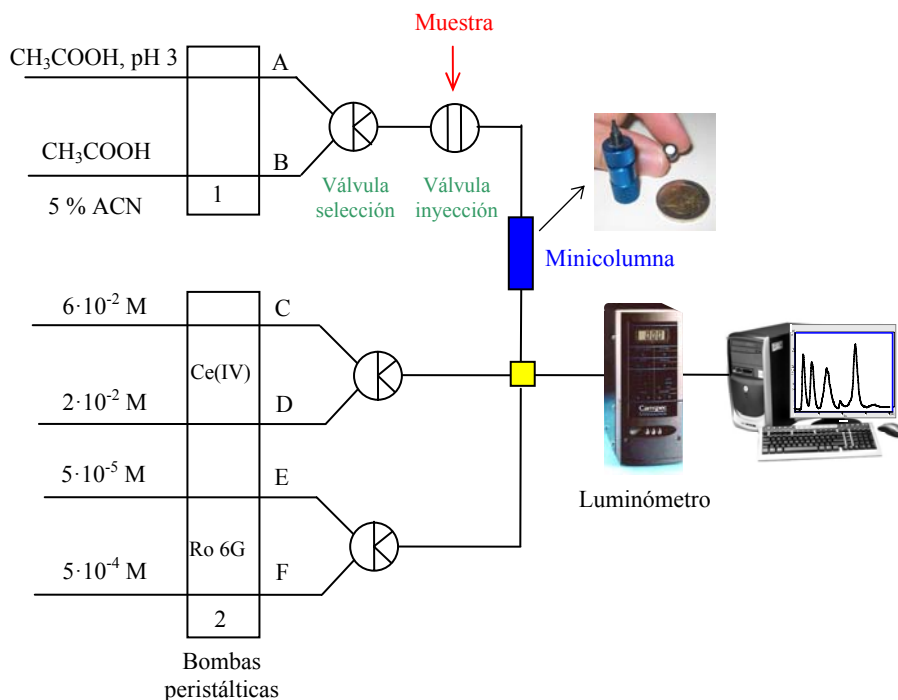


Figura 3.2 Configuración del sistema de flujo con minicolumna y detección QL.

Los programas informáticos empleados para el tratamiento de datos fueron: programa CSW32 suministrado por la casa DataApex Ltd. v 1.2.5 (2001) (Praga, República Checa). Para la interpretación y tratamiento de los datos quimioluminiscentes se usó el programa Statgraphics (Manugistics Inc. and Statistical Graphics Corporation, 1992, EE.UU.), ver.4.0 (1993) y Microsoft Office 2003.

3.2.3. Procedimiento

❖ *Patrones y muestras*

Muestras o patrones de los diferentes compuestos fenólicos (PH, DHBA, SA, MP y PG) con concentraciones entre 10^{-7} y 10^{-4} M y con la misma composición que el portador A, se introducen en el sistema de flujo a través de una válvula de inyección usando un bucle de 150 μl de capacidad (Figura 3.2). Se han utilizado dos fases móviles: un portador A formado por tampón acetato 0,1 M a pH 3,0 y un portador B formado por un tampón acetato 0,1 M a pH 3,0 con un 5 % v/v de ACN, trabajando en ambos casos a un flujo constante de 2,6 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$.

La detección QL se basa en la reacción con Ce(IV) y Rodamina 6G estableciendo para la determinación de los compuestos fenólicos en estudio dos configuraciones diferentes: 1) $6\cdot 10^{-2}$ M Ce(IV) en 0,5 M H_2SO_4 (disolución C) y $5\cdot 10^{-5}$ M Ro 6G (disolución E); y 2) $2\cdot 10^{-2}$ M Ce(IV) en 1,5 M H_2SO_4 (disolución D) y $5\cdot 10^{-4}$ M Ro 6G (disolución F). Estas disoluciones se hacen pasar por el sistema usando una segunda bomba peristáltica a una velocidad de flujo de 2,6 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$.

Inicialmente, el portador A fluye a través del sistema y se mezcla con las disoluciones C y E mediante un conector de 4 vías. 150 s después de que la válvula de inyección haya sido abierta, se cambia al portador B y al mismo tiempo se hace lo mismo cambiando las disoluciones C y E por las D y F, utilizando para ello una secuencia programada para las tres válvulas de selección. La señal analítica QL utilizada para la determinación de los compuestos fenólicos corresponde a la diferencia entre el máximo de la señal QL (I_1) y la señal de fondo (I_0). La relación entre la concentración y la altura del pico se estableció mediante calibración con patrones externos.

❖ *Referencia*

Se utilizó como método de referencia una adaptación del método HPLC-DAD propuesto por Mikami y col. [28]. Para ello se empleó una columna de sílice C_8 de 5 μm de tamaño de partícula y dimensiones 150 x 4,6 mm que trabaja en modo isocrático y utiliza como fase móvil agua:ácido acético (95:5) a un flujo constante de 1 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Los cromatogramas se obtuvieron a diferentes longitudes de onda: 260 nm (PH), 254 nm (DHBA), 300 nm (SA), 254 nm (MP) y 272 nm (PG). Para obtener la función de calibración se utilizaron 5 patrones de diferente concentración en la mezcla de compuestos fenólicos y 3 réplicas de cada uno utilizando la altura de pico como parámetro analítico.

❖ *Mantenimiento*

Para un correcto mantenimiento del sistema, especialmente de la minicolumna, es necesario antes de realizar cada análisis, introducir una corriente de ACN:H₂O al 10 % (v/v) a una velocidad de flujo de 2,0 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ durante 5 mi-

nutos para acondicionar la minicolumna. Al terminar, una vez que el último analito ha salido de la minicolumna, lo que sucede a los 280 segundos de la inyección en el sistema, el sistema se acondiciona con el portador A durante 30 segundos. Después de su utilización y para aumentar el tiempo de vida de la minicolumna, el sistema es lavado con el portador A durante 5 minutos y luego con agua otros 5 minutos.

3.2.4. Muestras

Para comprobar la validez del método desarrollado se analizaron un gel limpiador y una crema correctora de durezas. El gel limpiador está compuesto por agua, alcohol desnaturalizado, butilenglicol, propilenglicol, hexilenglicol, glicerina, ácido salicílico, trideceth-9, canela (*Cinnamomum zeylanicum*), extracto de cedro (*Cedrus atlantica*), portulaga (*Portulaca oleracea*), gluconato de cinc, gluconato de cobre, alantoína, capriloil glicina, etilhexanoato de PEG-5, sarcosina, citrato sódico, metilparaben, hidróxido sódico y fragancia.

La composición de la crema correctora de durezas es: agua, glicerina, ciclohexasiloxano, miristato de isopropilo, polietileno, estearato de PEG-2, alcohol cetearílico, trietanolamina, ácido salicílico, copolímero acrilamida / sodio acriloidimetiltaurato, estearato de PEG-100, alcohol estearílico, estearato de glicerina, iso-hexadecano, metilparaben, fenoxietanol, EDTA disódico, oleth-12, polisorbato 80 y fragancia.

3.2.5. Preparación de las muestras

Para el análisis del gel limpiador y de la crema correctora de durezas se hizo una adaptación del tratamiento de muestras propuesto por Mikami y col. [28]. Para ello, una cantidad adecuada de gel o crema (aproximadamente 1 g) se pesó

en un matraz esférico de 50 ml y se introdujo en un rotavapor durante 30 minutos a 90 °C para eliminar el agua. Después se añadieron 5 ml de acetato de etilo y tras mezclar e introducir en un baño de ultrasonidos durante 5 minutos se adicionaron 25 ml de hexano. Seguidamente, la muestra se purificó utilizando cartuchos de extracción en fase sólida tipo C₁₈ que fueron activados previamente con 10 ml de mezcla hexano:acetato de etilo (4:1). A continuación, se pasaron 2 ml de la disolución anterior a través del cartucho ya activado y sin realizar etapa de lavado, se eluyó utilizando la mezcla hexano:acetato de etilo (4:1). Tras la evaporación del disolvente en un rotavapor durante 5 minutos, el extracto se disolvió en 5 ml de ACN y 20 ml de agua. Cada muestra se analizó por triplicado midiendo la altura de pico como parámetro analítico.

3.3. Resultados y discusión

En trabajos anteriores de nuestro grupo de investigación se estudió la viabilidad de la separación de diferentes aditivos tales como parabenos [14] o mezclas de antioxidantes, conservantes y edulcorantes [15], utilizando una separación cromatográfica a baja presión mediante el empleo de una minicolumna monolítica incluida en el sistema de flujo y detección ultravioleta. En el capítulo anterior expusimos la separación de los parabenos utilizando una minicolumna monolítica con detección QL. Como vimos, la detección basada en medidas de QL ofrece ventajas tanto en sensibilidad como en límite de detección. En este capítulo estudiamos la separación de cinco compuestos fenólicos que se emplean habitualmente en la formulación de productos usados en dermatocósmica, basándonos en la detección QL junto con el empleo de columnas monolíticas como elemento separativo.

En este estudio la separación cromatográfica fue optimizada en primer lugar usando detección espectrofotométrica por simplicidad y conveniencia, para posteriormente realizar la optimización de la detección quimioluminiscente con los analitos ya separados, ajustando así los diferentes factores que influyen y considerando la influencia de las condiciones de separación en la detección quimioluminiscente.

3.3.1. Separación cromatográfica

Estudiamos dos mecanismos distintos para intentar la separación de los compuestos fenólicos seleccionados: en primer lugar mediante cambio iónico empleando para ello discos aniónicos como elemento separativo y en segundo lugar separaciones basadas en diferencias de polaridad sobre una minicolumna de tipo C₁₈. Estudios preliminares con el disco de cambio aniónico que llevamos a cabo trabajando a pH comprendidos entre 7 y 9 mostraron que, solo era posible la separación de DHBA y SA de los otros analitos que salían mezclados, lo que era debido tanto a las pequeñas diferencias que existen entre los valores de pK_a de los diferentes compuestos fenólicos (PH: 8,45 [29] y 8,88 [30]; DHBA: 3,12 y 8,82 [31]; SA: 2,98 [32] y 13,62 [33]; MP: 8,4 [34] y PG: 7,79 y 10,9 [35]), como a la corta longitud de la columna utilizada.

Si consideramos las diferencias de polaridad de los diferentes compuestos fenólicos en estudio, medidos por sus coeficientes de partición octanol-agua (log P), encontramos que a un pH de alrededor de 3 las diferencias son suficientes como para poder realizar una buena separación (PH log P: 0,16 [36], DHBA 1,63 [37], SA 1,68 [38], MP 1,91 [39] y PG 1,80 [40]).

Para verificar esta separación utilizamos una minicolumna de tipo C₁₈ trabajando en diferentes condiciones de pH (2-7), empleando tampones fosfato y acetato, así como ácido clorhídrico 10⁻² M, según el caso. Los resultados obtenidos se muestran en un diagrama de barras (Figura 3.3) donde se representan los tiempos de retención encontrados para los distintos analitos. Las barras horizontales mostradas en dicha figura indican la anchura del pico obtenido.

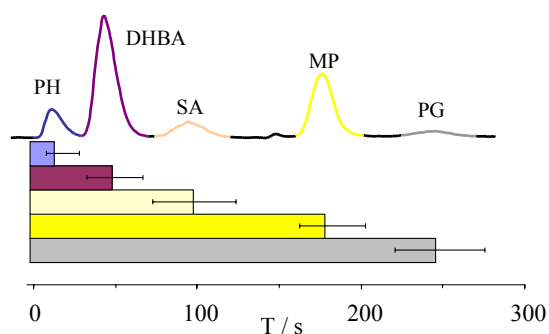


Figura 3.3 Representación de la separación de compuestos fenólicos mediante un diagrama de barras.

Como se observa en la Figura 3.4, un pH comprendido entre 2 y 3 permite la separación de PH, DHBA y SA debido al incremento de la supresión de la disociación de los fenoles más ácidos, como DHBA y SA, incrementando así el tiempo de retención.

En consecuencia, podríamos seleccionar como pH óptimo cualquier valor entre 2 y 3, sin embargo a pH 2 existe solapamiento entre MP y PG, por lo que seleccionamos pH 3 ajustado con tampón acetato 0,1 M como el portador más ade-

cuado. Además, en estas condiciones el tiempo de análisis es demasiado elevado (480 s) debido al alto tiempo de retención que presentan MP y PG.

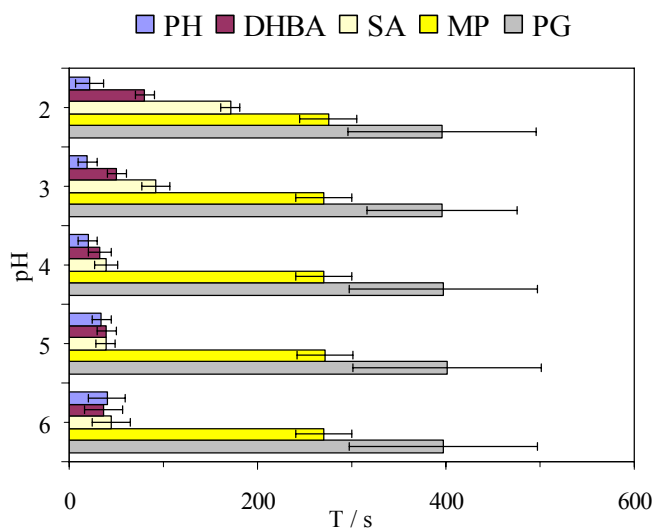


Figura 3.4 Dependencia del tiempo de retención respecto al pH. Todos los puntos son el promedio de tres réplicas. Las barras representan el tiempo de retención de cada compuesto fenólico y las barras de error la anchura del pico. Condiciones: $5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ para cada CFs. Velocidad de flujo: $1,2 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Volumen del bucle: $75 \mu\text{l}$.

Para disminuir el tiempo de análisis, reducimos la polaridad del portador añadiendo ACN. La Figura 3.5 muestra la disminución del tiempo de análisis con el aumento de la concentración de ACN. Se observa que a partir del 5 % de ACN tanto MP como PG acortan el tiempo de retención logrando así una buena resolución ($R_s > 1,2$). Sin embargo, a porcentajes iguales o mayores de ACN, la resolución de PH, DHBA y SA es menor de 0,8, lo que supone un solapamiento entre DHBA y SA.

Por lo tanto, la separación de los tres primeros CFs, como son PH, DHBA y SA, se puede llevar a cabo mediante un portador compuesto por tampón acetato 0,1 M a pH 3. Una vez que estos tres analitos han sido separados, el portador se cambia a otro compuesto por tampón acetato 0,1 M a pH 3 con un 5 % de ACN, reduciendo así el tiempo de análisis a 280 s.

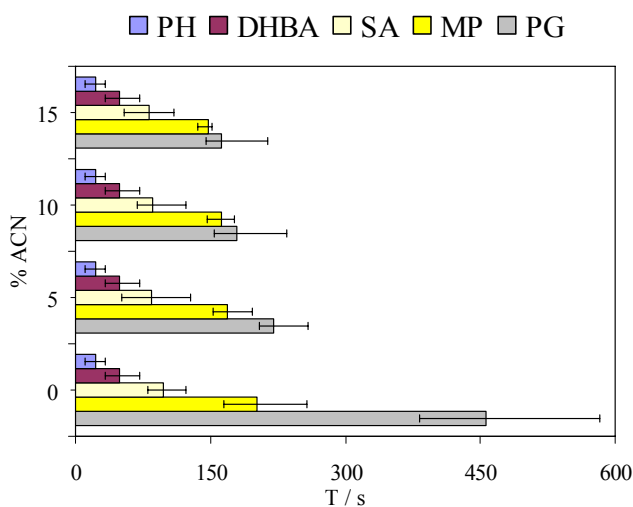


Figura 3.5 Dependencia del tiempo de retención respecto al % de ACN.

Se comprobó el efecto que producen columnas de diferente longitud (5 y 10 mm) sobre la separación. Con la columna de 10 mm no se observó ninguna ventaja con respecto a la columna de 5 mm, al trabajar en las condiciones de separación establecidas. Por ello se continuó trabajando con la columna de 5 mm.

Seguidamente se estudió la influencia de las condiciones de separación seleccionadas en la detección quimioluminiscente, comprobándose que la presencia de ACN en el portador hace disminuir la señal QL. Así, un 15 % de ACN supone una reducción de señal QL de un 15,3 %, comportamiento ya descrito por Gil García y col. [41]. Sin embargo, un porcentaje menor de ACN, un 5 % en el tampón acetato, tiene un efecto pequeño en la señal QL (1,3 %), por lo que resulta aceptable.

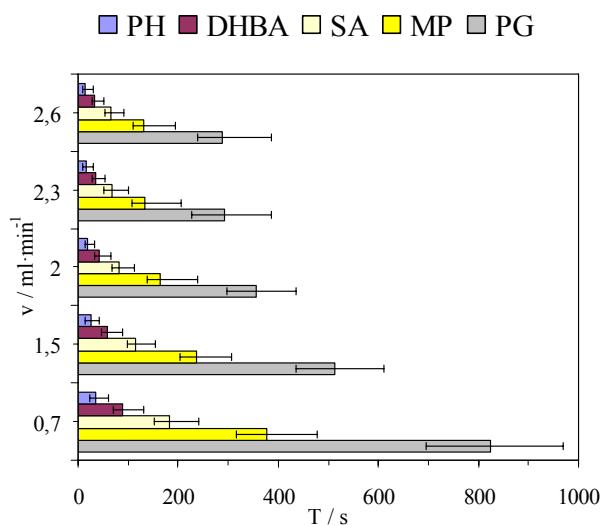


Figura 3.6 Variación del tiempo de retención con respecto a la velocidad de flujo. Condiciones: patrones: 5 mg·ml⁻¹; volumen del bucle: 75 μ l.

❖ *Velocidad de flujo de la separación*

Para estudiar la dependencia de la velocidad de flujo se ensayaron diferentes valores de velocidad en el intervalo de 0,8 a 2,6 ml·min⁻¹. Como se puede observar en la Figura 3.6, la mejor separación y menor tiempo de análisis, conside-

rando ancho de banda y resolución, corresponde a una velocidad de flujo de 2,6 ml·min⁻¹.

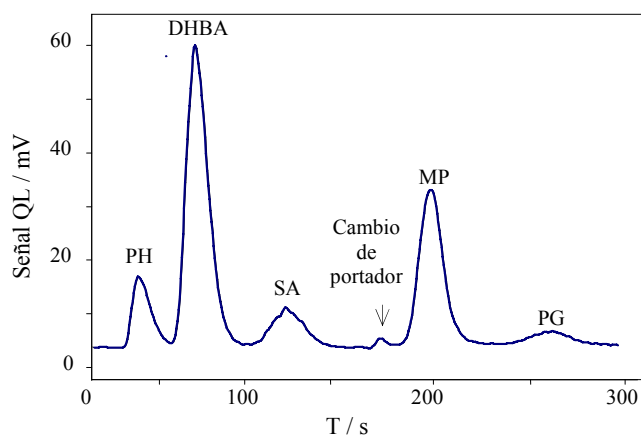


Figura 3.7 Registro de la separación con detección QL.

❖ *Condiciones de la separación*

Realizamos la separación de los compuestos fenólicos utilizando dos portadores: el portador A formado por tampón acetato 0,1 M de pH 3 y portador B formado por un 5 % ACN y tampón acetato 0,1 M de pH 3. El cambio del portador A al B se realiza utilizando válvulas de selección automatizadas a los 150 segundos, una vez que PH, DHBA y SA hayan salido de la minicolumna (primera parte del registro cromatográfico) se produce el cambio de portador, obteniéndose la separación para MP y PG (segunda parte del cromatograma). La secuencia de elución, con una resolución mayor de 1,2 en todos los casos, es: PH (24 s); DHBA (56 s); SA (105 s); MP (185 s); PG (250 s), siendo el tiempo de análisis de 280 s (Figura 3.7).

3.3.2. Detección quimioluminiscente

La detección de los compuestos fenólicos mediante quimioluminiscencia necesita una correcta selección de los reactivos QL así como la regulación de las condiciones QL. Para la detección de compuestos fenólicos se han propuesto diferentes reacciones QL, como el empleo de luminol [22], peroxioxalato [6] o Ce(IV) [25]. Nosotros hemos seleccionado para la detección de CFs la química basada en Ce(IV) por su versatilidad, selectividad y estabilidad. Este reactivo es utilizado habitualmente en presencia de diferentes sensibilizadores para incrementar la señal QL, tales como Tween 20 [25,42], Rodamina 6G [21], fluoresceína, sulfito o quinina [43]. El estudio que se realizó con distintos sensibilizadores para la reacción con Ce(IV) dió como resultado que tanto quinina, sulfito como fluoresceína no producen señal QL con compuestos fenólicos. Sin embargo, Rodamina 6G y Tween 20 o bien una mezcla de ambos, si originaron señales con diferentes compuestos fenólicos (Tabla 3.1). Las mejores prestaciones se obtuvieron utilizando solo Rodamina 6G, ya que el uso de Tween 20 redujo considerablemente la emisión QL y el empleo combinado de Ro 6G y Tween 20 [43] no ofreció una mejora substancial.

La optimización de las variables que afectan a la detección QL ha sido realizada estudiando de forma univariante las condiciones químicas para los diferentes CFs estudiados, seleccionando como resultado valores de compromiso a partir de los valores obtenidos. Los reactivos necesarios para la separación cromatográfica y para la posterior detección QL se conducen en líneas de flujo separadas (Figura 3.2), porque como ya ocurrió en el capítulo anterior, el uso de una sola línea de flujo que contenga también la Rodamina 6G origina una saturación

y obstrucción de la minicolumna, y en consecuencia empeora la eficiencia de la separación.

Tabla 3.1 Respuesta QL (%) para las diferentes reacciones con CFs.

Compuesto	Reacciones QL		
	Ce(IV) + Tween 20 ^a (%)	Ce(IV) + Ro 6G ^b (%)	Ce(IV) + Tween 20 + Ro 6G ^c (%)
Resorcinol	0,86	2,63	1,76
PH	0,00	42,33	0,00
DHBA	4,60	72,64	6,91
Rutósido	0,00	0,27	0,00
Ácido Caféico	0,60	0,35	0,00
Vainillina	0,74	0,77	0,00
SA	5,52	0,83	1,10
MP	0,98	100,00	4,40
PG	1,24	4,61	1,99

^a $6,4 \cdot 10^{-3}$ M de Ce(IV), 9 % Tween 20 y $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de CFs.

^b $2 \cdot 10^{-2}$ M de Ce(IV), $4 \cdot 10^{-4}$ M Ro 6G y $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de CFs.

^c $2 \cdot 10^{-2}$ M de Ce(IV), $4 \cdot 10^{-4}$ M Ro 6G, 9 % Tween 20 y $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de CFs.

❖ *Velocidad total de flujo*

La emisión QL se incrementa continuamente cuando lo hace la velocidad total de flujo originada por las dos bombas peristálticas usadas. Por esta razón, elegimos como velocidad la máxima alcanzada por la segunda bomba peristáltica, esto es $2,6 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, obteniendo con ello un flujo total de $5,2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.

❖ *Concentración de Ce(IV)*

Se examinaron los efectos de la concentración de Ce(IV), estudiada entre $6 \cdot 10^{-4}$ M y $6 \cdot 10^{-2}$ M en H_2SO_4 1,5 M, haciéndose reaccionar con Ro 6G $4 \cdot 10^{-4}$ M y con los CFs inyectados a través de un bucle de $75 \mu\text{l}$. Como se observa en la Figura

3.8, el máximo de la señal para los diferentes CFs ocurre a distintas concentraciones de Ce(IV): para PH, DHBA y SA, la óptima corresponde a $6 \cdot 10^{-2}$ M, y para MP y PG es de $2 \cdot 10^{-2}$ M. En todos los casos, excepto para MP, la señal se incrementa con la concentración hasta alcanzar un valor aproximadamente constante, observándose un máximo para MP. Este comportamiento es debido a que un incremento de la concentración de Ce(IV) implica un incremento en la velocidad de reacción por lo que el máximo de la reacción y por consiguiente de emisión quimioluminiscente ocurre antes de que el flujo alcance la cubeta del luminómetro [44,45].

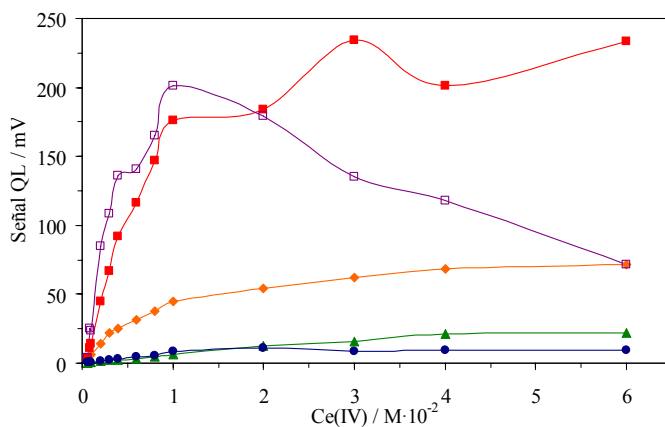


Figura 3.8 Optimización de la concentración de Ce(IV) (◆ PH, ■ DHBA, ▲ SA, □ MP, ● PG) utilizando $5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ para PH, SA y PG y $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ para DHBA y MP.

El mecanismo quimioluminiscente para MP y PG es diferente de los demás por la hidrólisis previa que experimentan, teniendo por ello un comportamiento

diferente, aspecto que se discutirá en el apartado referente al mecanismo que veremos posteriormente.

❖ *Concentración de H_2SO_4*

La reacción basada en Ce(IV) requiere condiciones de acidez alta con H_2SO_4 _[46]. Para su estudio se prepararon nueve disoluciones de concentraciones comprendidas entre 0,2 M y 2,6 M en H_2SO_4 para la generación de QL con CFs (Figura 3.9), trabajando a las concentraciones óptimas de Ce(IV) anteriores indicadas para cada uno de ellos.

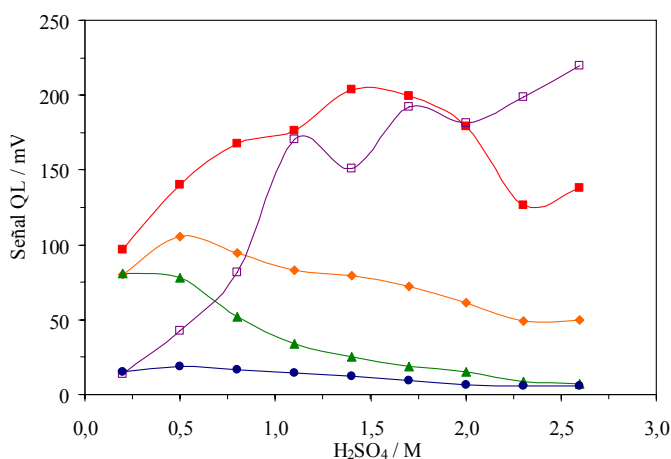


Figura 3.9 Optimización de la concentración de H_2SO_4 , obtenidas usando $Ro\ 6G\ 10^{-4}\ M$, $75\ \mu l$ de volumen de bucle y manteniendo constante las concentraciones óptimas de Ce(IV), (♦ PH, ■ DHBA, ▲ SA, □ MP, ● PG).

Se observa en la Figura 3.9 que las mejores condiciones de concentración de H_2SO_4 no son las mismas para todos los CFs estudiados, resultando 0,5 M para

PH, SA y PG y 1,5 M para DHBA y MP. A concentraciones mayores, podemos observar una disminución de QL al aumentar la acidez, lo cual es debido a la precipitación del sulfato de cerio (IV) a altas concentraciones de H_2SO_4 . Creager y col. [47] describen que la máxima concentración de Ce(IV) en disolución se encuentra a 0,5 M en H_2SO_4 , aspecto que está de acuerdo con los resultados encontrados por nosotros para PH, SA y PG. Sin embargo, para MP la señal se incrementa al aumentar la concentración de ácido debido a que una mayor acidez favorece la hidrólisis del mismo produciendo una mayor señal QL, tal como se discutirá en el apartado del mecanismo.

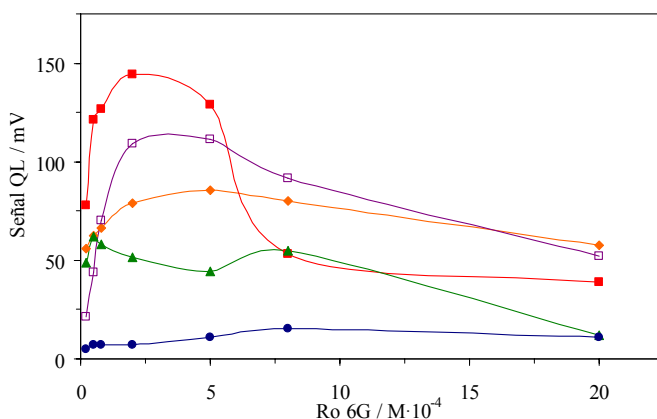


Figura 3.10 Optimización de la concentración de Ro 6G, obtenidas a partir 75 μ l de volumen de bucle y manteniendo constante las concentraciones óptimas de Ce(IV) y H_2SO_4 (◆ PH, ■ DHBA, ▲ SA, □ MP, ● PG).

❖ *Concentración de Rodamina 6G*

La influencia de la concentración de Ro 6G muestra un patrón similar para todos los CFs ensayados (Figura 3.10) aunque el máximo se alcanza a concentraciones diferentes de este reactivo: PH y MP ($5 \cdot 10^{-4}$ M); SA ($5 \cdot 10^{-5}$ M) y PG y DHBA ($8 \cdot 10^{-4}$ M).

Cuando la concentración de Ro 6G aumenta, la emisión QL decrece lentamente debido a la formación de dímeros no fluorescentes de Ro 6G que actúan como atenuadores de la emisión del monómero [48].

Como resultado del estudio anterior sobre las influencias de las concentraciones de Ce(IV), H_2SO_4 y Ro 6G, se observa que las concentraciones óptimas de trabajo son distintas para cada compuesto fenólico, lo que supone que para poder realizar el análisis en las mejores condiciones habría que diseñar un sistema de flujo complejo y engorroso.

Al objeto de seleccionar unas condiciones de compromiso, si observamos detenidamente las condiciones de trabajo para los distintos CFs, vemos que hay dos conjuntos de condiciones en el registro cromatográfico. En una primera parte tenemos PH, DHBA y SA y en una segunda parte MP y PG. En la primera parte consideramos que SA es el que debe encontrarse en sus mejores condiciones químicas debido a la baja emisión QL que presenta, por lo que para esta primera parte se eligieron 0,5 M en H_2SO_4 , $6 \cdot 10^{-2}$ M en Ce(IV) y $5 \cdot 10^{-5}$ M en Ro 6G. Esta elección supone un decrecimiento de QL para los compuestos PH y DHBA, siendo esta disminución de un 27 % y 50 %, respectivamente (Tabla 3.2).

Tabla 3.2 Condiciones óptimas y de compromiso de los diferentes CFs.

Analito	Condiciones óptimas			Condiciones de compromiso			QL ^b	
	Ce(IV) ^a	H ₂ SO ₄ ^a	Ro 6G ^a	Ce(IV) ^a	H ₂ SO ₄ ^a	Ro 6G ^a		
1ª parte (portador A)	PH	6·10 ⁻²	0,5	5·10 ⁻⁴	6·10 ⁻²	0,5	5·10 ⁻⁵	-27
	DHBA	6·10 ⁻²	1,5	8·10 ⁻⁴	6·10 ⁻²	0,5	5·10 ⁻⁵	-50
	SA	6·10 ⁻²	0,5	5·10 ⁻⁵	6·10 ⁻²	0,5	5·10 ⁻⁵	100
2ª parte (portador B)	MP	2·10 ⁻²	1,5	5·10 ⁻⁴	2·10 ⁻²	1,5	5·10 ⁻⁴	100
	PG	2·10 ⁻²	0,5	8·10 ⁻⁴	2·10 ⁻²	1,5	5·10 ⁻⁴	-60

^a Concentraciones molares (M).

^b Decrecimiento QL, valores en porcentaje.

Para la segunda parte del cromatograma, la selección de 0,5 M en H₂SO₄ sería la más adecuada, ya que correspondería al óptimo para PG debido a la baja emisión QL que presenta, sin embargo esta elección supone un decrecimiento drástico en la emisión QL del MP. Por ello, se escogen las mejores condiciones para MP, que son: 1,5 M en H₂SO₄, 2·10⁻² M en Ce(IV) y 5·10⁻⁴ M en Ro 6G. Esta elección supone un decrecimiento de un 60 % en la señal QL para el PG, pero aún en estas condiciones es posible la determinación de los dos analitos con una sensibilidad adecuada. El resumen de las condiciones tanto óptimas como la de compromiso pueden verse en la Tabla 3.2.

❖ *Volumen del bucle*

Estudiamos bucles de diferentes longitudes, lo que implica diferentes volúmenes de muestra, de 25 a 500 µl. La resolución entre pares de picos adyacentes (Rs) decrece ligeramente al aumentar el volumen de 25 a 150 µl (PH-DHBA 2,4 a 1,6, DHBA-SA 2,5 a 2,0, SA-MP 3,9 a 3,6, MP-PG 2,7 a 2,5). De 150 a 300 µl, la resolución decrece considerablemente, especialmente en la primera parte de la separación cromatográfica (PH-DHBA 1,6 a 0,8, DHBA-SA 2,0 a 1,1,

SA-MP 3,6 a 4,1, MP-PG 2,5 a 2,7), resultando en un fuerte solapamiento en la secuencia PH-DHBA-SA como puede verse en la Figura 3.11.

Con respecto a la señal QL, ésta se incrementa al aumentar el volumen del bucle de 25 a 150 μl para todos los CFs, pero de 150 a 500 μl decrecen excepto para MP, el cual continúa aumentando (Figura 3.12). Por lo tanto decidimos seleccionar como volumen óptimo de bucle el valor de 150 μl debido a los buenos valores tanto de intensidad QL como de resolución, siendo éste último el factor determinante.

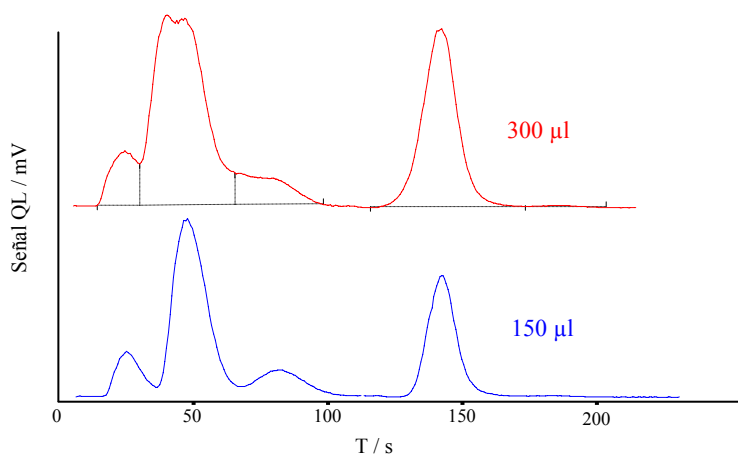


Figura 3.11 Registro de la influencia del aumento del volumen del bucle.

❖ Fuerza iónica

La influencia de la fuerza iónica se estudió añadiendo diferentes cantidades de NaCl al portador (hasta una concentración de 0,25 M), no observando, como se debería esperar para este tipo de analitos, ninguna influencia sobre el tiempo de

retención. En consecuencia, no fue necesaria la adición de sales a los portadores.

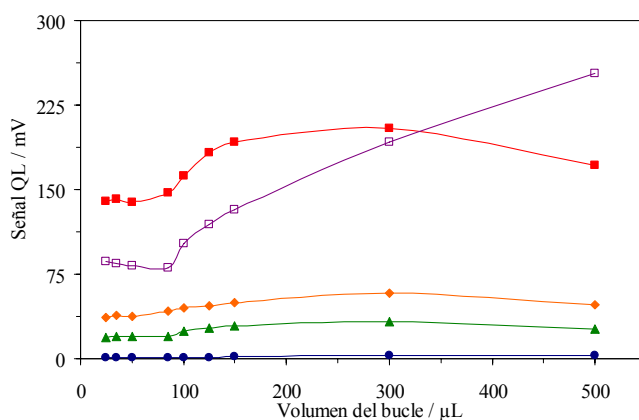


Figura 3.12 Optimización del volumen del bucle (◆ PH, ■ DHBA, ▲ SA, □ MP, ● PG).

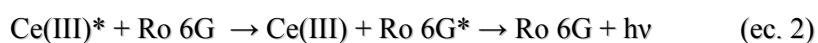
3.3.3. Mecanismo de emisión quimioluminiscente

El mecanismo de la generación QL de los compuestos fenólicos utilizando la reacción Ce(IV)-Ro 6G ha sido estudiada por diferentes autores[21,25,49,50]. Básicamente, cuando el Ce(IV) reacciona con Ro 6G, ocurre una pequeña emisión quimioluminiscente, debida a la siguiente reacción redox:



La Ro 6G_{ox} no es fluorescente [51] y el Ce(III) originado se encuentra en su estado excitado. Este Ce(III)* puede volver a su estado fundamental originando

a su vez una pequeña emisión QL, pero en presencia del fluoróforo Ro 6G le transfiere su energía emitiendo más luminiscencia [21]:



En este trabajo hay dos tipos de analitos: 1) los CFs que contienen un éster en su molécula (MP y PG) y 2) los CFs que solo contienen grupos hidroxilo junto a grupos ácido carboxílico en algún caso (PH, DHBA y SA).

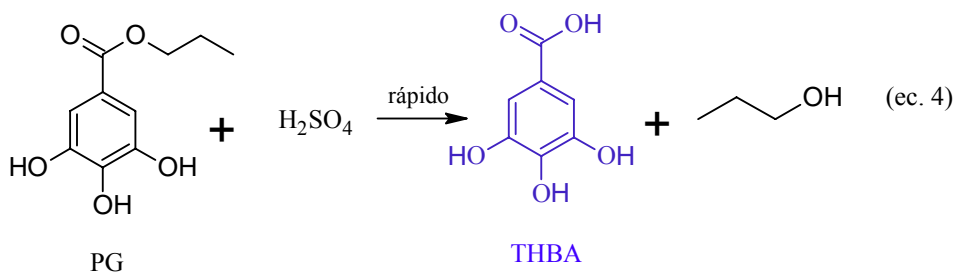
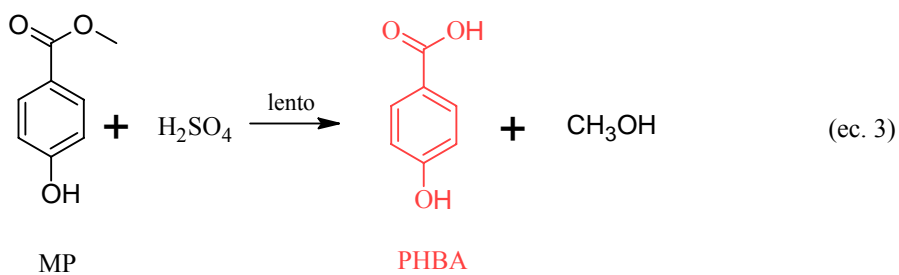


Figura 3.13 Hidrólisis de MP y PG.

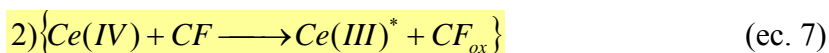
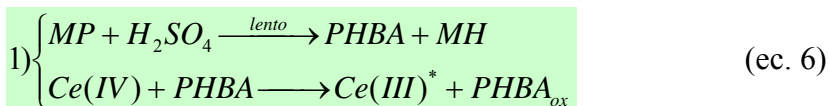
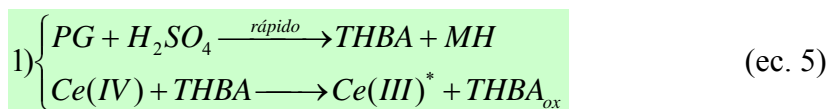
1) MP y PG son hidrolizados en medio ácido produciendo el ácido p-hidroxibenzóico (PHBA) ó el ácido 3,4,5-trihidroxibenzóico (THBA) y su correspondiente alcohol, respectivamente (Figura 3.13).

Éstos ácidos son fácilmente oxidados por el Ce(IV) produciendo Ce(III)* como describen Hua Cui y col. [50] originando los correspondientes productos de oxidación PHBA_{ox} y THBA_{ox}. Este Ce(III)* en presencia de Ro 6G da lugar a una emisión más intensa debido a una producción más eficiente de Ce(III)* [46]. Haciendo una estimación de la constante de hidrólisis ácida de estos esteres utilizando el programa SPARC [52] obtenemos un valor de $2,42 \cdot 10^{-7} \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ para MP y de $2,3 \cdot 10^{-3} \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ para PG, resultando por tanto que la velocidad de hidrólisis de PG es mayor que la de MP. Estos datos confirman el resultado obtenido para la optimización de la concentración de H₂SO₄ (Figura 3.9) donde se observa que PG esta completamente hidrolizado a una concentración de H₂SO₄ 0,5 M mientras que MP necesita condiciones más ácidas para una hidrólisis más eficiente. Por otro lado, la emisión de PHBA es mayor que la del THBA, como también afirman Hua Cui y col. [21] aspecto que se puede confirmar considerando como medida del carácter reductor de estas moléculas los potenciales de semionda ($E_{1/2}$) de estos compuestos, siendo el PHBA un producto más reductor (0,64 V) que el THBA (0,01 V) [53]. Por su parte, el decrecimiento de la emisión del compuesto THBA es debido a la formación de un complejo entre el Ce(IV) con los dos grupos hidroxilo del THBA adyacentes ($K_f = 3,24 \cdot 10^{-2} \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1}$) [54].

2) PH, DHBA y SA son oxidados por Ce(IV) en una primera instancia. El Ce(III)* producido genera una emisión QL en presencia de Ro 6G [46]. Depen-

diendo de la distribución de los grupos hidroxilo en la moléculas de los compuestos fenólicos obtenemos diferentes intensidades QL [21]. Este comportamiento esta en concordancia con el carácter reductor de las moléculas ($E_{1/2}$): DHBA (0,68 V)>PH (0,52 V)>SA (0,48 V) [53].

Resumiendo, las emisiones QL de los diferentes compuestos fenólicos obedecen a las siguientes reacciones:



3.3.4. Parámetros analíticos

Como es habitual en los métodos quimioluminiscentes utilizamos la altura de pico para la determinación de los compuestos fenólicos. La función de calibrado para todos los CFs estudiados (Figura 3.14) se consigue linealizar aplicando una función doblemente recíproca: $1/I = a \cdot 1/X + b$ (Figura 3.15) la cual es obtenida empleando tres réplicas de cada patrón y nueve patrones para cada función de calibrado. El test de fallo de ajuste se utilizó en todos los casos para comprobar la linealidad.

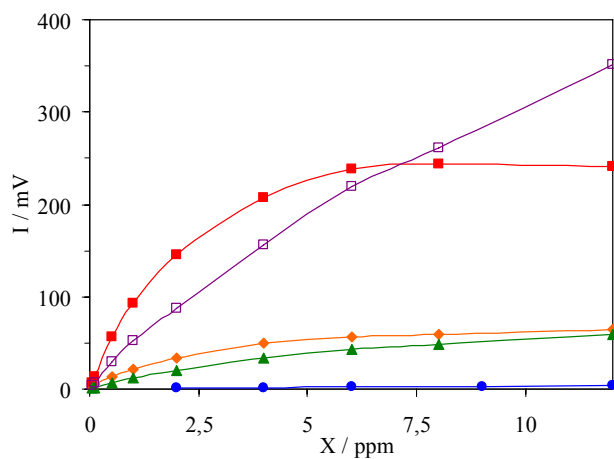


Figura 3.14 Representación gráfica de patrones para los distintos compuestos fenólicos (♦ PH, ■ DHBA, ▲ SA, □ MP, ● PG).

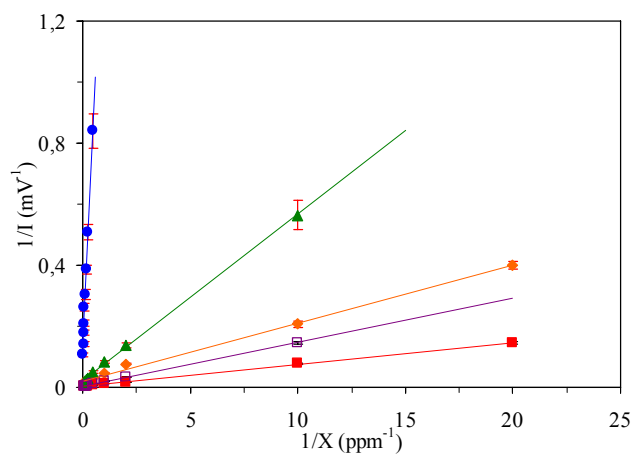


Figura 3.15 Calibrado linealizado de los compuestos fenólicos (♦ PH, ■ DHBA, ▲ SA, □ MP, ● PG).

En la Tabla 3.3 se presentan los parámetros analíticos para los compuestos fenólicos estudiados. Como la calibración es doblemente recíproca, el límite de detección (LD) y el límite de cuantificación (LQ) se calcularon a partir del criterio estándar [55] $LD = y_b + 3s_b$ y $LQ = y_b + 10s_b$, donde y_b es la media del blanco y s_b es la desviación estándar para diez blancos.

Tabla 3.3 Parámetros analíticos del método para la mezcla de compuestos fenólicos.

Parámetro	Compuestos fenólicos				
	PH	DHBA	SA	MP	PG
b/ mV^{-1}	0,017	0,0036	0,020	0,0031	0,114
S_b/ mV^{-1}	0,001	0,0003	0,004	0,0004	0,008
$a/mg \cdot l^{-1}$	0,0191	0,00719	0,054	0,0144	1,50
$S_a/mg \cdot l^{-1}$	0,0001	0,00004	0,001	0,0001	0,04
$R^2/\%$	99,76	99,91	99,23	99,83	98,18
RDL/M	$3,96 \cdot 10^{-7}$	$3,24 \cdot 10^{-7}$	$7,24 \cdot 10^{-7}$	$6,57 \cdot 10^{-7}$	$9,43 \cdot 10^{-6}$
	a	a	a	a	a
LD/M	$9,52 \cdot 10^{-5}$	$7,79 \cdot 10^{-5}$	$8,69 \cdot 10^{-5}$	$7,89 \cdot 10^{-5}$	$2,36 \cdot 10^{-4}$
LQ/M	$8,80 \cdot 10^{-8}$	$2,70 \cdot 10^{-8}$	$2,30 \cdot 10^{-8}$	$5,15 \cdot 10^{-8}$	$4,08 \cdot 10^{-6}$
DER*/%	13,50	4,61	6,22	2,42	9,81
DER**/%	4,43	2,75	5,16	3,61	6,83
DER***/%	4,36	2,86	2,59	4,17	6,67

b pendiente; S_b desviación estándar de la pendiente; a ordenada en el origen; S_a desviación estándar de la ordenada en el origen; R coeficiente de correlación; RDL rango dinámico lineal; LD límite de detección; LQ límite de cuantificación; DER* desviación estándar relativa para una concentración de $0,05 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de los CFs (baja concentración); DER** desviación estándar relativa para una concentración de $2 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de los CFs (concentración media); DER*** desviación estándar relativa para una concentración de $12 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de los CFs (alta concentración).

Los parámetros analíticos muestran que PG presenta una menor precisión y sensibilidad debido a su menor señal QL. La frecuencia de muestreo resultante es de aproximadamente de 13 h^{-1} . El método propuesto muestra resultados satis-

factorios para la cuantificación de cada compuesto fenólico en presencia de diferentes relaciones de CFs coexistentes (1:5 / 5:1) sin interferencia de las señales QL ni tampoco pérdida en la resolución ($R_s > 1,5$ en todos los casos).

Comparando las características analíticas de esta técnica de separación a baja presión con la determinación HPLC con detección quimioluminiscente para el análisis de los compuestos fenólicos [49], encontramos un mayor rango lineal para HPLC (un orden de magnitud), valores similares para el límite de detección, tiempos de retención más cortos para nuestra técnica (PH 0,4 min; DHBA 0,9 min; SA 1,75 min; MP 3,1 min; PG 4,2 min) respecto a HPLC (PH 2,4 min; DHBA 12,0 min; SA 29,1 min; MP 9,7 min; PG 2,7 min) y una mayor precisión para HPLC (1,3-4,4 %) que para el método propuesto por nosotros (2,7-6,8 %). Sin embargo la configuración presentada en este trabajo ofrece buenas resoluciones para un número reducido de compuestos fenólicos, como es el caso, con un tiempo corto de análisis e instrumentación económica.

3.3.5. Aplicaciones analíticas

El método propuesto ha sido aplicado al análisis de productos que se utilizan para el cuidado de la piel, dermocosméticos, como son un gel limpiador y una crema correctora de durezas, las cuales contienen dos de los cinco compuestos fenólicos estudiados en este capítulo, SA y MP (Figura 3.16). MP y SA son empleados por su parte como conservantes en alimentos, cosméticos, adhesivos, pegamentos y cuero [50] y el ácido salicílico ha sido usado recientemente como agente blanqueador en cosméticos y como un agente exfoliante en cremas del cuidado de la piel [56].

Para la extracción de los CFs en los productos estudiados realizamos una adaptación del tratamiento de la muestra propuesto por Mikami y col. [28]. La validez de los procedimientos de extracción se comprobó mediante la adición de cantidades conocidas de cada uno de los compuestos fenólicos ensayados. La recuperación de los mismos, medidos por triplicado, mostró valores comprendidos entre 93,1 y 100,2 %.

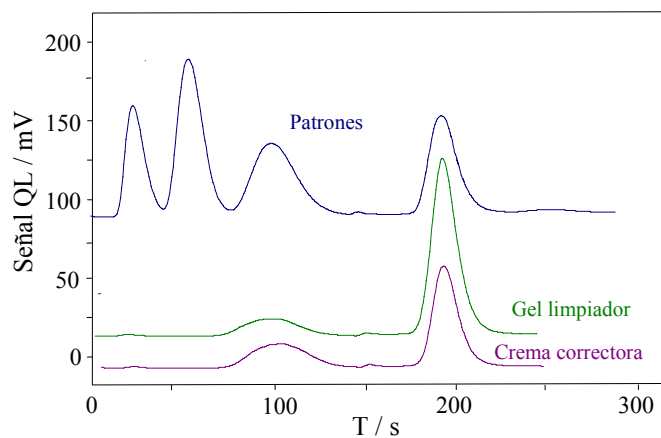


Figura 3.16 Separación obtenida para el gel limpiador y la crema correctora.

La Tabla 3.4 muestra los resultados obtenidos utilizando el método propuesto y el procedimiento HPLC de referencia. Esta tabla incluye los valores medios de las 3 determinaciones realizadas para cada muestra, las desviaciones estándar de las mediciones y el valor de probabilidad P (P_v) de comparación de resultados y validación del método.

Tabla 3.4 Resultados obtenidos por el método propuesto y el de referencia en muestras reales.

Muestra	Analito	Método propuesto*	Método referencia*	P, / %
Gel limpiador	SA	14,0 ± 0,1	14,08 ± 0,04	75,8
	MP	9,1 ± 0,5	9,6 ± 0,3	17,7
Crema correctora de durezas	SA	16,8 ± 0,4	17,96 ± 0,05	5,0
	MP	4,2 ± 0,2	4,289 ± 0,007	5,0

*Concentraciones expresadas en $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$.

Como puede verse, los valores de precisión del método de referencia HPLC son mayores que los del método propuesto, pero éste en cambio utiliza una instrumentación muy simple, rápida y económica que además ofrece buenos límites de detección. Los inconvenientes que presenta este método se refieren a su baja precisión y su limitada capacidad de separación debida a la longitud de la columna, aunque sin embargo es suficiente para la determinación de estos tipos de analitos.

3.4. Conclusión

Se ha efectuado con éxito la determinación de una mezcla de cinco compuestos fenólicos tales como el PH, DHBA, SA, MP y PG utilizando un sistema cromatográfico a baja presión mediante una minicolumna monolítica (5 mm) con detección quimioluminiscente.

Uno de los problemas habituales en la detección QL en técnicas separativas consiste en la selección de las condiciones QL. Aquí hemos utilizado dos condiciones químicas diferentes, basadas en la química de Ce(IV)-Rodamina 6G, incorporadas en el sistema de flujo y agrupadas de forma que en unas condiciones se detectase PH, DHBA y SA y en unas segundas condiciones MP y PG,

con la consecuente mejora en la sensibilidad de la detección QL. El procedimiento fue quimiométricamente validado y aplicado al análisis de productos dermocosméticos comparando resultados con un método de referencia HPLC. El método propuesto es práctico, simple, rápido, de fácil mantenimiento y económico, pudiendo determinar niveles de $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Los valores de repetibilidad (% DER) fluctúan, para niveles medios de concentración de los CFs, entre un 2 y un 6 %. Es de destacar que la incorporación de válvulas rotatorias controladas mediante una secuencia programada facilita su uso y empleo en análisis de rutina.

3.5. Bibliografía

1. M. Ahmaruzzaman, *Adv. Colloid Interface Sci.* 143 (2008) 48.
2. Olmos Acebes, L. *Dermocosmética*, Dermocosmos.com: 2008.
3. T. Serot, C. Lafficher, *Food Chem.* 82 (2003) 513.
4. A. Escarpa, M.C. Gonzalez, *Anal. Chim. Acta* 427 (2001) 119.
5. Terashima, C.; Fujishima, A. *Comprehensive Analytical Chemistry*, Alegret, S.; Merkoçi, A., Eds.; 2007; Chapter 11.
6. K. Tsukagoshi, T. Kameda, M. Yamamoto, R. Nakajima, *J. Chromatog. A* 978 (2002) 213.
7. J.L. Adcock, P.S. Francis, K.M. Agg, G.D. Marshall, N.W. Barnett, *Anal. Chim. Acta* 600 (2007) 136.
8. P. Chocholous, D. Satinsky, P. Solich, *Talanta* 70 (2006) 408.
9. K. Cabrera, *J. Sep. Sci.* 27 (2004) 843.

-
10. S. Pelletier, C.A. Lucy, *J.Chromatog.A* 1118 (2006) 12.
 11. H.M. Gonzalez-San Miguel, J.M. Alpizar-Lorenzo, V. Cerda-Martin, *Talanta* 72 (2007) 296.
 12. D. Satinsky, J. Huclova, R.L.C. Ferreira, M.C. Montenegro, P. Solich, *J.Pharm.Biomed.Anal.* 40 (2006) 287.
 13. J. Klimundova, D. Satinsky, H. Sklenarova, P. Solich, *Talanta* 69 (2006) 730.
 14. J.F. Garcia-Jimenez, M.C. Valencia-Miron, L.F. Capitan-Vallvey, *J.Anal.Chem.* In press (2008) .
 15. J.F. Garcia-Jimenez, M.C. Valencia, L.F. Capitan-Vallvey, *Anal.Chim.Acta* 594 (2007) 226.
 16. P.N. Nesterenko, M.A. Rybalko, *Dokl.Chem.* 404 (2005) 178.
 17. B. Paull, C.O. Riordain, P.N. Nesterenko, *Chem.Comm.* (2005) 215.
 18. D. Connolly, D. Victory, B. Paull, *J.Sep.Sci.* 27 (2004) 912.
 19. D. Victory, P. Nesterenko, B. Paull, *Analyst* 129 (2004) 700.
 20. A.M. Garcia Campaña, F.J. Lara, *Anal.Bioanal.Chem.* 387 (2007) 165.
 21. H. Cui, Q. Zhang, A. Myint, X. Ge, L. Liu, *J.Photochem.Photobiol., A* 181 (2006) 238.
 22. B. Haghighi, R. Dadashvand, *Anal.Bioanal.Chem.* 384 (2006) 1246.
 23. J.W. Costin, N.W. Barnett, S.W. Lewis, D.J. McGillivery, *Anal.Chim.Acta* 499 (2003) 47.
 24. Q. Zhang, H. Cui, A. Myint, M. Lian, L. Liu, *J.Chromatog.A* 1095 (2005) 94.

25. H. Cui, J. Zhou, F. Xu, C.Z. Lai, G.H. Wan, *Anal.Chim.Acta* 511 (2004) 273.
26. E. Tyrrell, P.N. Nesterenko, B. Paull, *J.Liquid Chromatog.Rel.Tech.* 29 (2006) 2201.
27. L.F. Capitan-Vallvey, M.C. Valencia Miron, G. Gutiérrez del Moral, Método de control electromecánico de válvulas rotatorias para la inserción y mezcla de fluidos, ES2079308 (1996).
28. E. Mikami, T. Goto, T. Ohno, H. Matsumoto, M. Nishida, *J.Pharm.Biomed.Anal.* 28 (2002) 261.
29. J. Jover, R. Bosque, J. Sales, *QSAR Comb.Sci.* 26 (2007) 385.
30. C.T. Abichandani, S.K.K. Jatkar, *J.Indian Inst.Sci.* 21A (1938) 417.
31. M.M.D. Sierra, A.N. Fernandes, B. Szpoganicz, *Talanta* 62 (2004) 687.
32. K.J. Reszka, L.H. Britigan, B.E. Britigan, *J Pharmacol Exp Ther* 315 (2005) 283.
33. R. Porto, G. De Tommaso, E. Furia, *Ann.Chim.* 95 (2005) 551.
34. K.L. Kuo, Y.Z. Hsieh, *J.Chromatog.A* 768 (1997) 334.
35. N. Binbuga, K. Chambers, W.P. Henry, T.P. Schultz, *Holzforschung* 59 (2005) 205.
36. Hansch, C.; Leo, A. *Log P Database*, Claremont CA, 1987.
37. Y. Korenman, T.P. Koroleva, *Zh.Prikl.Khim.* 48 (1975) 1413.
38. K. Carlsson, B. Karlberg, *Anal.Chim.Acta* 423 (2000) 137.
39. T. Angelov, A. Vlasenko, W. Tashkov, *J.Liquid Chromatog.Rel.Tech.* 31 (2008) 188.
40. I. Boyd, E.G. Beveridge, *Microbios* 24 (1979) 173.

-
41. R. Santiago Valverde, I. Sanchez Perez, F. Franceschelli, M. Martinez Galera, M.D. Gil Garcia, *J.Chromatog.A* 1167 (2007) 85.
 42. H. Cui, S. Li, X. Lin, *Analyst* 126 (2001) 553.
 43. Y. Huang, C. Zhang, X. Zhang, Z. Zhang, *Anal.Chim.Acta* 391 (1999) 95.
 44. W. Liu, Y. Huang, *Anal.Chim.Acta* 506 (2004) 183.
 45. J. Ballesta-Claver, M.C. Valencia-Miron, L.F. Capitan-Vallvey, *Talanta* In press (2008) .
 46. Y. Huang, Z. Chen, *Talanta* 57 (2002) 953.
 47. A. Paulenova, S.E. Creager, J.D. Navratil, Y. Wei, *J.Power Sources* 109 (2002) 431.
 48. T. Taguchi, S. Hirayama, M. Okamoto, *Chem.Phys.Lett.* 231 (1994) 561.
 49. Q. Zhang, M. Lian, L. Liu, H. Cui, *Anal.Chim.Acta* 537 (2005) 31.
 50. A. Myint, Q. Zhang, L. Liu, H. Cui, *Anal.Chim.Acta* 517 (2004) 119.
 51. S. Feng, X. Chen, G. Zhang, J. Fan, *Lihua Jianyan, Huaxue Fence* 39 (2003) 221.
 52. S.H. Hilal, S.W. Karickhoff, L.A. Carreira, B.P. Shrestha, *QSAR Comb.Sci.* 22 (2003) 917.
 53. H. Cui, R. Meng, H. Jiang, Y. Sun, X. Lin, *Luminescence* 14 (1999) 175.
 54. U.R. Chaudhari, B.M. Rao, *Z.Phys.Chem.* 270 (1989) 412.
 55. Miller, N. J.; Miller, J. C. *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*, 4 ed.; Prentice Hall: Madrid, 2002.
 56. J.F. Jen, Y.Y. Tsai, T.C. Yang, *J.Chromatog.A* 912 (2001) 39.

Capítulo 4

DETERMINACIÓN DE HIPOCLORITO EN AGUAS UTILIZANDO UN SENSOR QUIMIOLU- MINISCENTE DE UN SOLO USO

*"Tras un año de investigación, uno cae en la cuenta de que podía haberse
hecho en una semana"*



*Williams Lawrence Bragg (1890-1971)
Premio Nobel de Física en 1915*

"Mi verdad básica es que todo tiempo es un ahora en expansión"



*Severo Ochoa de Albornoz (1905-1993)
Premio Nobel de Medicina (1959)*

CAPÍTULO 4: DETERMINACIÓN DE HIPOCLORITO EN AGUAS UTILIZANDO UN SENSOR QUIMIOLUMINISCENTE DE UN SOLO USO

4.1. Introducción

La determinación rápida y precisa de la presencia o concentración de analitos diana es de interés en todas las áreas, incluyendo el diagnóstico médico, el control medioambiental y el industrial. De los diferentes tipos de métodos rápidos que se encuentran en el mercado, los métodos de química seca, también conocidos como tiras reactivas o sensores de un solo uso, son probablemente los que dan lugar al mercado de mayor actividad y con el mayor volumen de ventas. Sus ventajas incluyen bajos costos, facilidad de manejo, corto tiempo de análisis y capacidad para tomar decisiones rápidas cuando surgen problemas imprevistos sin necesidad de utilizar un laboratorio convencional. Varios ejemplos se pueden ver en la Figura 4.1.

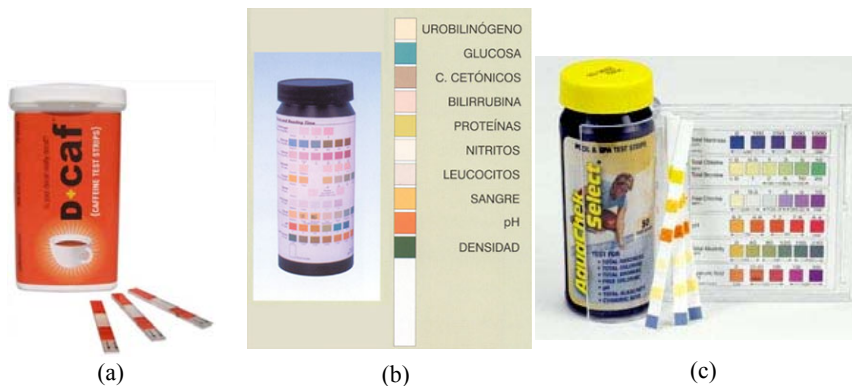


Figura 4.1 Ejemplos de sensores comerciales de un solo uso: a) identificación de cafeína en líquidos; b) análisis de orina; c) análisis de aguas (Aquacheck®).

En química seca, las reacciones químicas se pueden llevar a cabo sobre el propio sensor de un solo uso siendo el analito detectado en el elemento sensor tras la reacción con diversos reactivos cuando se añade el problema sobre el dispositivo de ensayo o bien se sumerge en él. El uso de adecuadas químicas secas en combinación con una escala de color, instrumentos de sobremesa o dispositivos miniaturizados hace posible obtener el resultado del ensayo [1]. Entre los sensores de un solo uso, los más comúnmente utilizados son los basados en la medida de reflectancia difusa, absorción de la radiación o fluorescencia y en mucha menor extensión los que emplean quimioluminiscencia (QL).

Los sensores de un solo uso quimioluminiscentes patentados son de tipo enzimático o inmunológico generalmente. En ellos, la medida quimioluminiscente es realizada mediante un luminómetro o a través de diferentes tipos de películas fotográficas [2], ya sea con un densitómetro o un escáner [3]. Los sensores enzimáticos o biosensores de un solo uso son elementos analíticos multicapa. Furuya y col. [4] han desarrollado un biosensor de un solo uso para el análisis de glucosa que contiene una capa de reactivos con luminol y el sistema enzimático glucosa oxidasa/peroxidasa en polímeros hidrofílicos. Vogelhut utiliza la misma química [5], pero su capa reactiva contiene el sistema quimioluminiscente encapsulado en microcápsulas osmosensibles para mejorar el tiempo de vida. Además añade una capa fotosensible compuesta por una película fotográfica recubierta con una capa protectora que da autonomía al sistema.

También se han descrito sensores de un solo uso de tipo inmunoensayo quimioluminiscente, tanto en formato homogéneo como heterogéneo. Se han propuesto

diversos ensayos de formato heterogéneo, incluyendo ensayos de hibridación de ácidos nucleicos, ensayos inmunoquímicos tales como inmunoensayos enzimáticos, ensayos tipo sandwich, competitivos y directos.

Las zonas más habituales en estos ensayos de un solo uso son la capa de reactivos y la capa de captura. La capa de reactivos contiene el ligando marcado que genera la señal y que se une inmunoquímicamente al analito. Esta marca o etiqueta pueden ser enzimas tales como peroxidasa [6] u otros tales como glucosa oxidasa o fosfatasa alcalina [7]. Alternativamente se han usado como etiquetas proteínas bioluminiscentes, tales como la aequorina [8]. La capa de captura contiene un agente enlazante, como por ejemplo avidina, un antígeno, un anticuerpo o un receptor, inmovilizados por absorción o por enlace covalente en soportes tales como vidrio o bolas de polímeros, fibras o membranas, en la zona de difusión o en una capa intermedia alternativa la cual es capaz o bien de competir con el analito por los lugares de unión o enlazarse con un complejo analito-reactivo. La separación de la etiqueta no unida, así como de interferentes procedentes de la muestra, de la zona de reacción se realiza previamente a la medida quimioluminiscente y se puede llevar a cabo aplicando a la zona una corriente de un líquido de lavado en volumen suficiente para separar los compuestos no enlazados de la zona de reacción.

Los actuales inmunoensayos de película delgada habitualmente tienen un volumen de lavado de entre 10 a 20 μl , aunque es posible incrementar este volumen de lavado a 1 ml, dependiendo del espesor del elemento [6]. El uso de una capa adsorbente alrededor del área de lectura elimina el líquido de lavado de este

área. La adición de una disolución con la química de detección (luminol, peróxido de hidrógeno/perborato, surfactantes, sensibilizadores [9]) al sensor de un solo uso desencadena la reacción quimioluminiscente.

En el caso de formatos homogéneos, se emplean sensores de un solo uso de tres zonas. La segunda zona atrapa al ligando marcado proveniente de la primera zona que no ha reaccionado con el analito. La tercera zona, por su parte, contiene los productos químicos necesarios para originar la respuesta quimioluminiscente, como por ejemplo calcio cuando la fotoproteína aequorina se utiliza como etiqueta de anticuerpos empleados como ligandos. Si se usan anticuerpos enzimáticos marcados, la tercera zona contiene luminol entre otros reactivos necesarios [8].

También se ha descrito un ensayo en formato tipo varilla para discriminar entre tres pesticidas del grupo de las s-triazinas, utilizando un inmunoensayo competitivo con un hapteno marcado con peroxidasa del rábano picante. El uso de una red neuronal hace posible la discriminación entre analitos [10]. De la misma manera, se ha propuesto un inmunoensayo competitivo con detección quimioluminiscente para el cribado del herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) en muestras de agua [11].

La determinación de cloro libre (HClO , ClO^- , Cl_2) es importante tanto para los proveedores, como para los consumidores industriales o domésticos debido al uso generalizado de estos compuestos como desinfectantes del agua. Hay dife-

rentes sensores de un solo uso tanto visuales como colorimétricos basados mayoritariamente en el uso de indicadores redox como los de tipo benzidina [12,13] o en la reacción con yodo y un polímero tipo celulósico [14].

En este capítulo hemos desarrollado un sensor monocapa de un solo uso para la determinación de hipoclorito basado en la medida de la quimioluminiscencia producida por la reacción de hipoclorito con el anión fluoresceinato. El sensor propuesto aquí ofrece suficiente sensibilidad para su aplicación en aguas.

4.2. Experimental

4.2.1. Productos químicos y materiales

Todos los productos químicos utilizados fueron de calidad reactivo analítico. El agua utilizada a lo largo del estudio fue de ósmosis inversa producida por un sistema de purificación Milli-RO 12 más Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EE.UU.). La disolución patrón de hipoclorito se preparó diariamente por dilución de una disolución de hipoclorito sódico al 10 % (Panreac, Barcelona, España), cuyo pH se ajustó a un pH de 9,5 con HCl 10^{-2} M y se estandarizó por yodimetría. Como reactivo para la reacción quimioluminiscente se utilizó fluoresceína (CAS nº 171832), obtenida también de Panreac. Para la preparación de membranas se utilizó el hidrogel de poliuretano D-4 de Tyndall-Plains-Hunter Ltd (Ringo, NY, EE.UU.), cloruro de polivinilo de alto peso molecular (PVC), polivinilpiridina (PVP) y triacetato de celulosa, siendo todos ellos suministrados por Sigma (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España).

Otros productos químicos empleados fueron tributilfosfato (TBP), tetrafenilborato de tetraheptilamonio (TFB) (Fluka, Buchs, Suiza), Aliquat 336 y tetrahidrofurano (THF). Además se usaron cromatoplacas de Silicagel 60 sobre hojas de aluminio (Merck, Darmstadt, Alemania), resina de cambio aniónico Sephadex QAE-25 (Sigma), papel de cambio aniónico Whatman DE-81 (Whatman, Maidstone, UK), además de láminas de poliéster tipo Mylar (Goodfellow, Cambridge, UK) usadas como soporte.

4.2.2. Instrumentación y programas informáticos

La emisión de quimioluminiscencia fue medida mediante un luminómetro CL-1 de la casa comercial Camspec (Camspec Ltd., Cambridge, UK) equipado de un módulo externo para la medida de QL, tanto en membrana como en disolución, usando cubetas estándar UV-Visible. Este accesorio consiste en una caja metálica de forma rectangular que incorpora un soporte porta-cubetas. Este soporte está fabricado en hierro y pintado de negro mate que se cierra por la parte superior mediante un cierre con sujeción. Al cerrar el módulo se activa un interruptor que pone en funcionamiento el fotomultiplicador (PMT) que se encuentra situado frente a la cubeta de medida. Este interruptor está diseñado para prevenir la entrada de luz exterior e impedir la saturación del PMT cuando el sistema está abierto, es decir, a la hora de extraer o introducir la cubeta de medida. El cierre presenta un orificio central donde se sitúa un tubo negro de PVC de 6 cm de longitud para introducir la muestra.

Para chequear y comprobar la fiabilidad de los datos obtenidos, este módulo externo lleva incorporado un LED y un interruptor (Figura 4.2). El luminómetro se conectó a un ordenador mediante la tarjeta de integración INT7 - 24 bit A/D.

La introducción de la muestra en el módulo externo del luminómetro se realizó mediante jeringas convencionales de diferentes volúmenes utilizando un sistema neumático de doble acción diseñado por nosotros para mejorar la repetibilidad y reproducibilidad de las medidas.

Los espectros de fluorescencia se registraron con un espectrofotómetro de fluorescencia Cary Eclipse provisto de sistema Peltier para mantener constante la temperatura (Varian, Palo Alto, CA, EE.UU.) y los espectros de reflectancia difusa de los sensores de un solo uso se midieron con un espectrofotómetro Lambda 2 UV/Vis (Perkin Elmer, Ueberlingen, Alemania) gracias al accesorio de reflectancia incorporado.

Entre otros aparatos y materiales de laboratorio se utilizó un dispositivo de recubrimiento por giro para la preparación de membranas diseñado por nosotros [15], un pH-metro digital de la marca Crison con un electrodo combinado de calomelanos saturado (Crison Instruments, Barcelona, España) y cubetas de vidrio (OS) y de cuarzo (QS) de la casa comercial Hellma (Hellma Hispania, Badalona, España) (100-OS y 100-QS) de 1, 2, 5 y 10 mm de paso de luz.

Los programas informáticos empleados para el tratamiento de datos fueron: programa CSW32 suministrado por la casa DataApex Ltd. v 1.2.5 (2001) (Praga, República Checa), Statgraphics (Manugistics Inc. and Statistical Graphics Corporation, 1992, EE.UU.), ver.4.0 (1993) y Microsoft Office 2003.

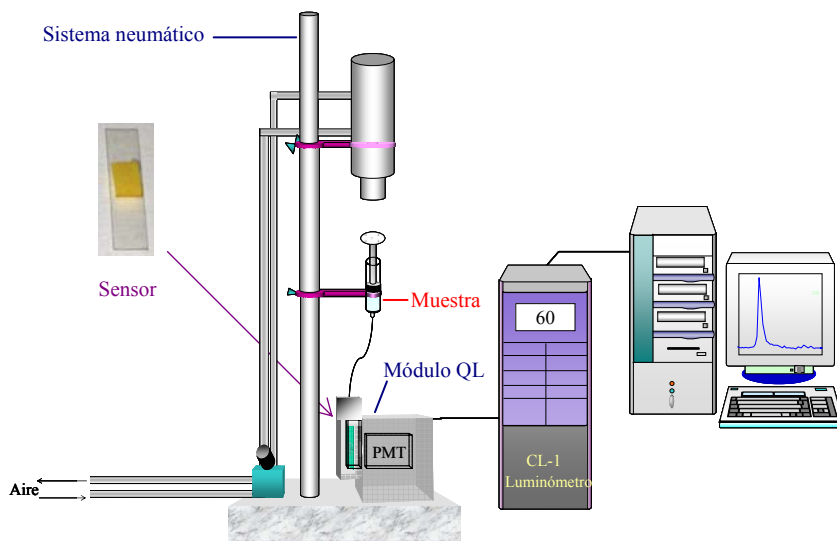


Figura 4.2 Dispositivo utilizado para la medida de los sensores quimioluminiscentes de un solo uso.

4.2.3. Preparación de la membrana

Los sensores de un solo uso sensibles a hipoclorito se prepararon sumergiendo en placas Petri de 50 ml tiras de papel celulósico de cambio aniónico DE-81 de 10 x 90 mm en una disolución de fluoresceinato sódico (uranina) $3 \cdot 10^{-4}$ M (pH=10,5). Transcurridos 5 minutos, se lavaron durante 30 segundos con agua en otra placa Petri para posteriormente dejarlos secar durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación, los papeles aniónicos de color amarillo se cortaron en piezas de dimensiones de 10 x 9 mm adhiriéndolos a soportes de tipo Mylar de dimensiones 10 x 40 x 0,5 mm mediante una disolución de triacetato de celulosa $7 \cdot 10^{-4}$ M en diclorometano (Figura 4.3) para preparar sensores de un solo uso (Figura 4.4) que se almacenaron a temperatura ambiente protegidos de la luz ambiente hasta su uso.

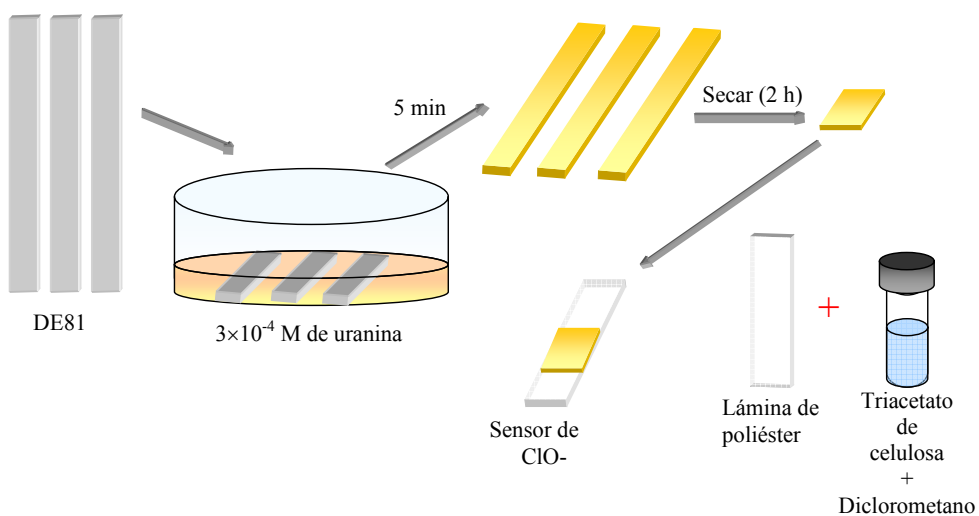


Figura 4.3 Esquema para la preparación de los sensores de un solo uso para la determinación de hipoclorito.

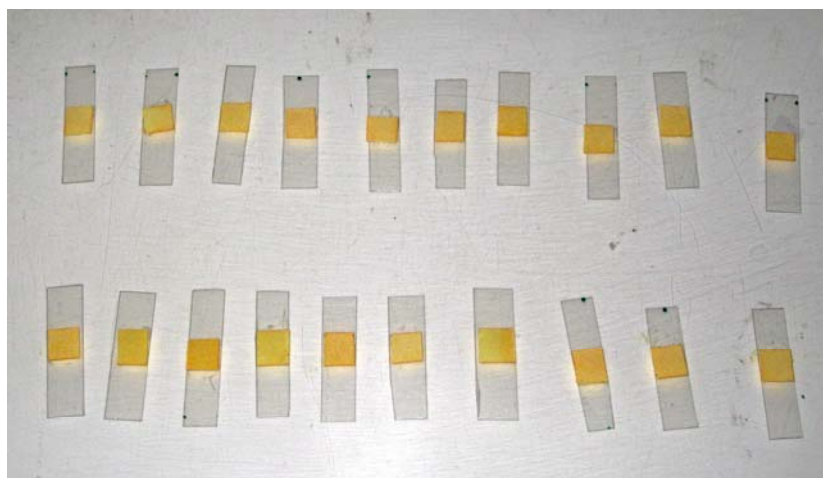


Figura 4.4 Preparación de sensores de un solo uso QL en papel aniónico DE-81.

4.2.4. Medidas de quimioluminiscencia

La luz emitida por el sensor de un solo uso se midió directamente por el fotomultiplicador (PMT) del luminómetro sin discriminación de longitudes de onda. El parámetro analítico que se utilizó fue la altura de pico de la señal luminiscente.

4.2.5. Procedimiento

❖ *Patrones y muestras*

Se prepararon alícuotas de una disolución patrón conteniendo entre 2,0 y 52,0 mg·l⁻¹ de hipoclorito, o bien de un problema, con el pH ajustado a 9,5 mediante NaOH o HCl según su pH, para finalmente tomar un volumen de 1 ml con una jeringa. El sensor de un solo uso se situó en un lateral de una cubeta de 5 mm de paso de luz, situada a su vez en el interior del módulo externo del luminómetro, en concreto frente al PMT. Después de cerrar la tapa del accesorio por medio de dos arandelas, se inyectó la muestra a través del tubo de PVC en la cubeta mediante una jeringa empujada mediante un pistón neumático, lo que originó y permitió medir la emisión quimioluminiscente. La función de calibración se obtuvo mediante disoluciones de hipoclorito de concentración conocida.

4.3. Resultados y discusión

4.3.1. Selección de reactivos y soporte sólido

De los diferentes colorantes xanténicos ensayados, rodamina 6G, pironina Y y uranina (Figura 4.5), se seleccionó uranina porque aunque los otros dos colorantes daban señales más intensas, lo hacían de forma lenta [16] incrementando el tiempo de análisis.

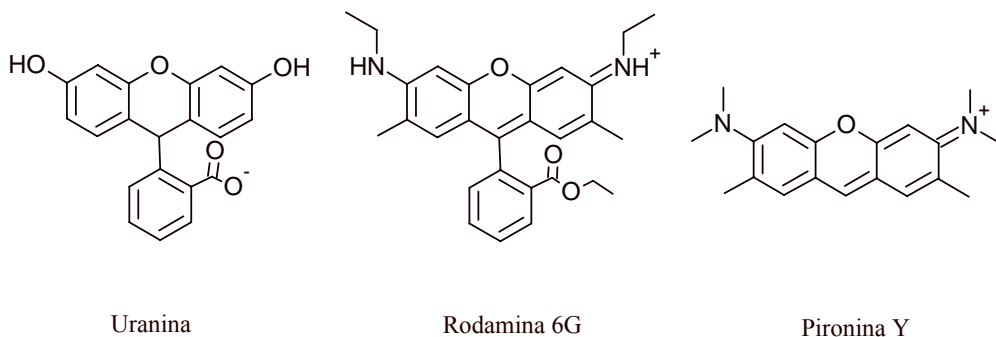


Figura 4.5 Colorantes xanténicos utilizados: uranina, rodamina 6G y pironina Y.

Se ensayaron diferentes tipos de membranas para retener al anión fluoresceinato y servir de soporte para la reacción con hipoclorito y producir quimioluminiscencia. Entre ellos se probaron:

- 1) polímeros formadores de membrana, que actúan como una matriz de inmovilización tales como poliuretano D-4, PVP, PVC y triacetato de celulosa.
- 2) soportes sólidos que retengan fluoresceinato por adsorción o cambio iónico, como cromatoplasmas de sílicagel, papel de celulosa convencional o el papel de cambio aniónico DE-81 que contiene grupos amino como grupos funcionales.

En el primer caso, las membranas se prepararon a partir de disoluciones de los propios polímeros además del fluoresceinato sódico, depositando un volumen sobre un soporte transparente mediante un dispositivo de recubrimiento por giro

(Figura 4.6) o, alternativamente, utilizando un cambiador aniónico tipo Sephadex en ciclo fluoresceinato disperso en una disolución de un polímero hidrofílico.



Figura 4.6 Dispositivo de giro para la preparación de membranas circulares.

En el segundo caso, la zona sensora se preparó adicionando un volumen conocido de una disolución acuosa de fluoresceinato sódico mediante una micropipeta y dejándola secar a temperatura ambiente. En ambos casos, la cantidad de colorante por unidad de área fue similar.

Las diferentes membranas preparadas conteniendo fluoresceinato sódico se ensayaron con una disolución de hipoclorito 10^{-3} M, mostrando que la mejor señal quimioluminiscente la originaba el papel de cambio aniónico DE-81 (100

%) frente a poliuretano D-4 (74 %), PVP (26 %) y PVC (13 %). Las otras membranas preparadas no respondieron a hipoclorito y la membrana de celulosa lixiviaba fluoresceinato en contacto con agua. Por ello, se seleccionó el papel aniónico DE-81 como fase sólida para inmovilizar fluoresceinato sódico debido a la alta señal quimioluminiscente que ofrecía, al corto tiempo de respuesta, su reproducibilidad, facilidad de preparación y la posibilidad de reutilización.

4.3.2. Reacción quimioluminiscente en fase sólida

El espectro de reflectancia difusa del sensor de un solo uso conteniendo uranina muestra una banda ancha con un máximo a 510 nm (490 nm en disolución). Tras reaccionar con hipoclorito, el máximo de la señal se desplaza hacia el rojo hasta una longitud de onda de 527 nm, apareciendo un leve color rojo sobre el sensor. La fluorescencia emitida desde la superficie del papel muestra una longitud de onda de excitación y de emisión de λ_{exc} 517 nm y λ_{em} 541 nm, respectivamente (λ_{exc} 489 nm y λ_{em} 519 nm en disolución) y tras reaccionar con hipoclorito las longitudes de onda no se modifican sustancialmente, λ_{exc} 518 nm y λ_{em} 547 nm.

El espectro de quimioluminiscencia tiene un máximo de emisión entre 537 y 547 nm. Estos datos muestran que la reacción es sensibilizada por el propio fluoresceinato sódico o por una sustancia relacionada (Figura 4.7) ya que la longitud de onda de emisión del fluoresceinato sódico coincide con la longitud de onda de emisión quimioluminiscente.

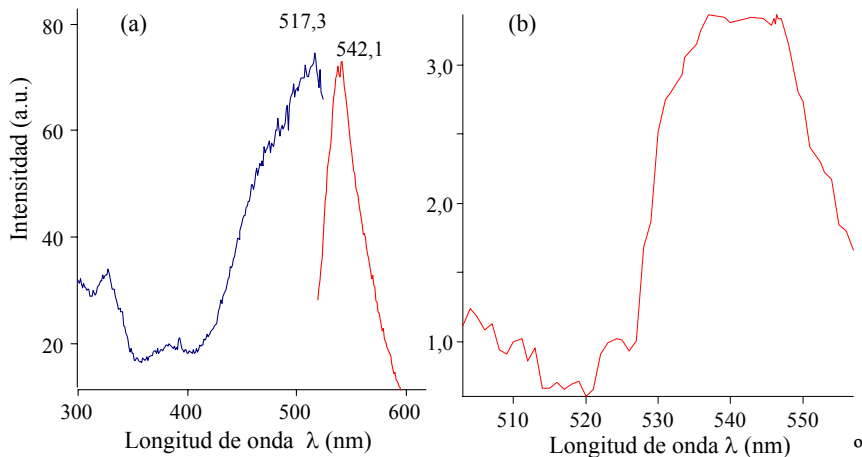


Figura 4.7 Espectros de fluorescencia (a) y quimioluminiscencia (b) del sensor de un solo uso conteniendo fluoresceinato sódico.

Simultáneamente a la reacción quimioluminiscente, el papel de cambio iónico amarillo cambia su color a un color rojo no muy intenso inmediatamente después de la adición de hipoclorito y permanece sin cambio, excepto si la concentración de hipoclorito es muy alta, en cuyo caso el papel es completamente decolorado.

Para explicar este fenómeno consideremos que la molécula de fluoresceína puede existir de tres formas: en disolución una estructura de lactona incolora, una estructura zwitteriónica, que dota a la disolución de color amarillo y una estructura para-quinoidea que sólo aparece en estado sólido y que presenta un color rojo intenso [17] (Figura 4.8). De las dos formas existentes en disolución, predomina la estructura zwitteriónica, por eso la disolución tiene color amarillo, la

cual es dependiente del pH, siendo más fluorescente si se encuentra la molécula totalmente desprotonada.

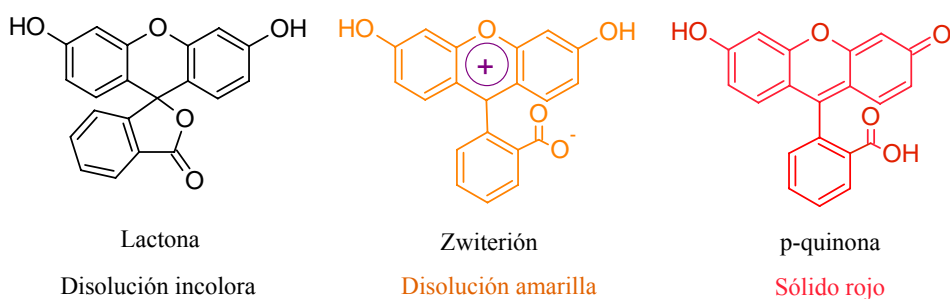


Figura 4.8 Fórmulas moleculares de la fluoresceína en estado sólido y en disolución, obtenido de [17].

Este fenómeno puede explicarse si se considera el mecanismo de la reacción quimioluminiscente con hipoclorito. Este mecanismo es similar al que tiene lugar en la reacción de Rodamina 6G con hipoclorito [18] u otros colorantes xanténicos [19,20] a través de la producción de oxígeno singlete ($^1\text{O}_2^*$). La reacción de hipoclorito con el anión fluoresceinato provoca la ruptura de esta molécula generándose dióxido de carbono con una serie de derivados que conducen a la producción de oxígeno singlete [21,22] (Figura 4.9).

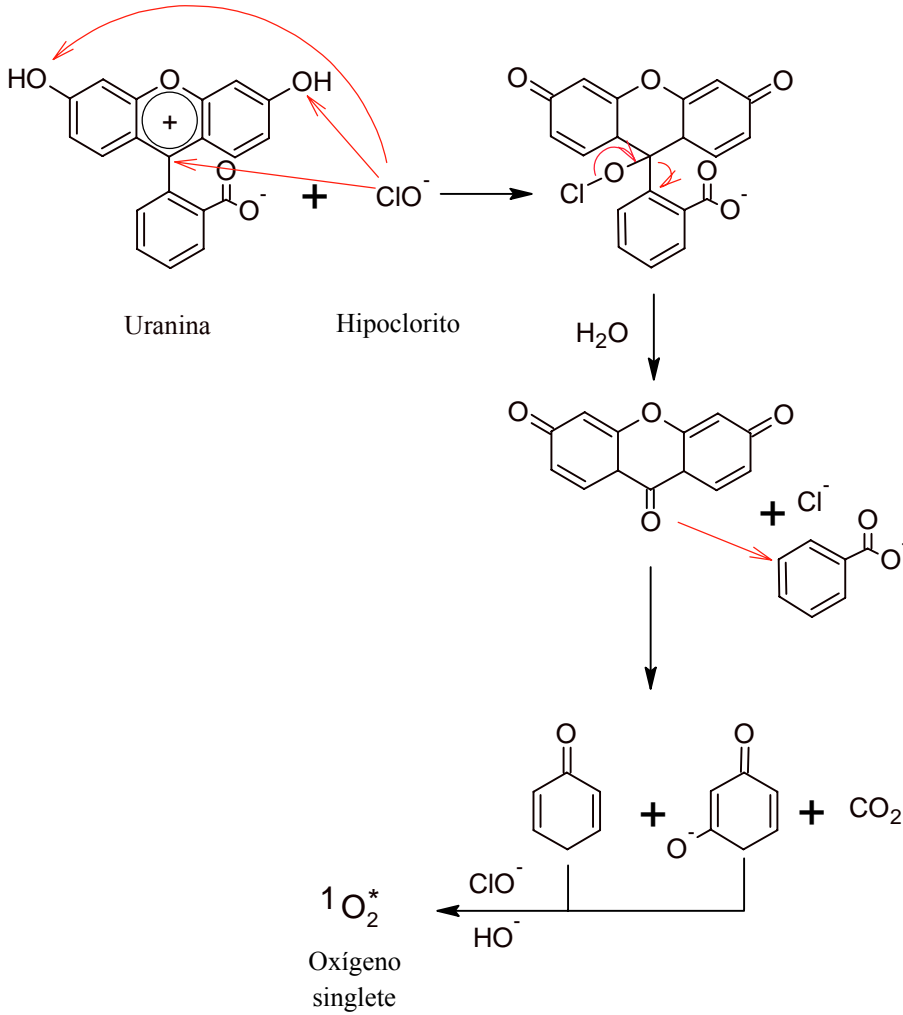


Figura 4.9 Formación de oxígeno singlete.

Posteriormente ocurre una transferencia de energía del oxígeno singlete al anión fluoresceinato produciéndose así una emisión quimioluminiscente sensibilizada

[23] (Figura 3.10). La oxidación de hipoclorito puede no ser completa y con ello puede que sólo se oxide al grupo hidroxilo del anillo bencénico produciéndose la forma p-quinoidea de la fluoresceína en fase sólida (Figura 4.8), dotando a la tira reactiva del color rojo observado tras la reacción. Del mecanismo se deduce que al igual que se determina hipoclorito se puede determinar también peróxido de hidrógeno con una sensibilidad mayor.

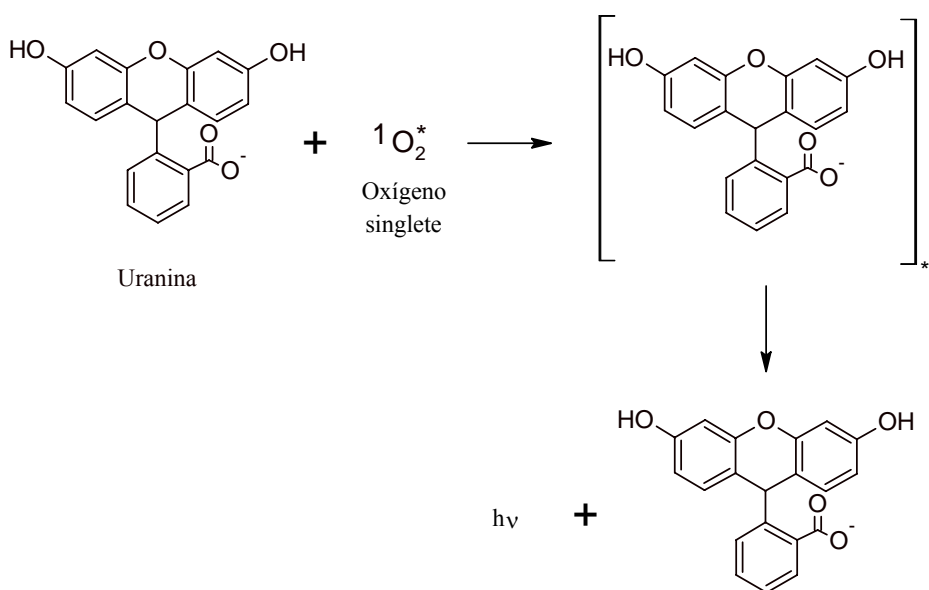


Figura 4.10 Generación de QL sensibilizada por la uranina.

4.3.3. Optimización del sensor de un solo uso

Las respuestas del sensor de un solo uso quimioluminiscente se optimizaron teniendo en consideración: 1) factores relacionados al diseño y composición de la zona sensora (concentración de reactivos, tiempo de contacto, tiempo de secado y diseño del sensor); y 2) las variables relacionadas con la reacción de hipoclorito (pH, fuerza iónica, concentración de hipoclorito).

La zona sensora se preparó impregnando tiras del papel de cambio aniónico seleccionado en una disolución de fluoresceinato sódico (pH = 10,5) durante 5 minutos. Después de la retención, fue necesario eliminar el exceso del reactivo ya que es retenido tanto por intercambio iónico como por adsorción, y presenta diferente comportamiento dependiendo del proceso de retención. La señal es mayor y más rápida si el fluoresceinato es retenido por adsorción que por cambio iónico, pero la reproducibilidad de la preparación de la membrana es menor y tiene lugar lixiviación desde la zona sensora. Por ello, tras la retención de fluoresceinato lavamos el papel de cambio iónico con agua para eliminar el efecto de adsorción en la medida de lo posible. Las tiras de papel se secaron a temperatura ambiente durante 2 horas antes de su utilización.

Como las tiras de papel así preparadas ofrecen difícil manejo y mala reproducibilidad cuando se inyecta la muestra con hipoclorito en el dispositivo experimental antes descrito, se optó por cortar el papel de fluoresceina en piezas de 10 x 9 mm adhiriéndolas a una tira transparente de poliéster de 10 x 40 mm mediante una disolución de triacetato de celulosa en diclorometano. Se obtienen con ello las señales más intensas cuando la anchura del papel aniónico de fluo-

resceína es de 10 mm, ya que ésta coincide con la anchura de la cubeta óptica. Además, la altura a la que se posiciona el papel aniónico en la tira de poliéster es de importancia, siendo la señal máxima si la altura desde el fondo a la zona sensora es mayor o igual a 16 mm, es decir, la señal aumenta cuanto más cerca esté de la ventana del fotomultiplicador.

Para estudiar la influencia de la concentración de fluoresceinato se utilizaron disoluciones entre 10^{-3} y 10^{-4} M manteniendo un tiempo de impregnación constante en el papel aniónico de 5 minutos. La mayor señal quimioluminiscente obtenida correspondió a una concentración de $3 \cdot 10^{-4}$ M (Figura 4.11)

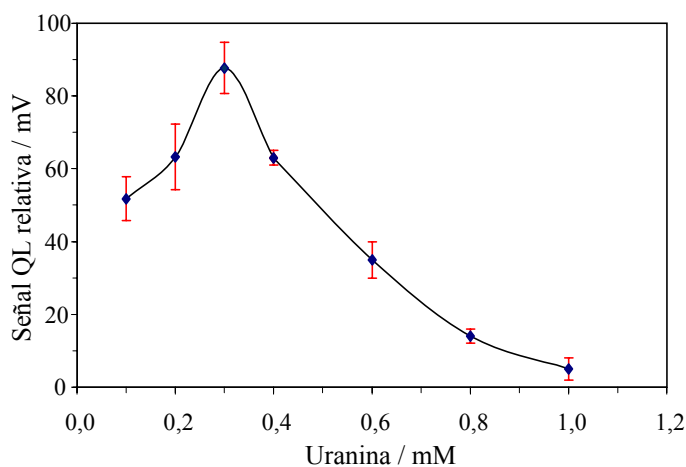


Figura 4.11 Influencia de la concentración de fluoresceinato en la tira reactiva.

La disminución observada a altas concentraciones de ión fluoresceinato puede ser debida a una autoabsorción de la luminiscencia emitida por el propio fluo-

resceinato excitado como sugiere el solapamiento observado en los espectros de fluorescencia de esta molécula inmovilizada en papel aniónico y de los estudios de reflectancia difusa (véase Figura 4.7). El uso de altos tiempos de impregnación utilizando la misma concentración de fluoresceinato sódico conduce al mismo resultado, un decrecimiento de la señal quimioluminiscente.

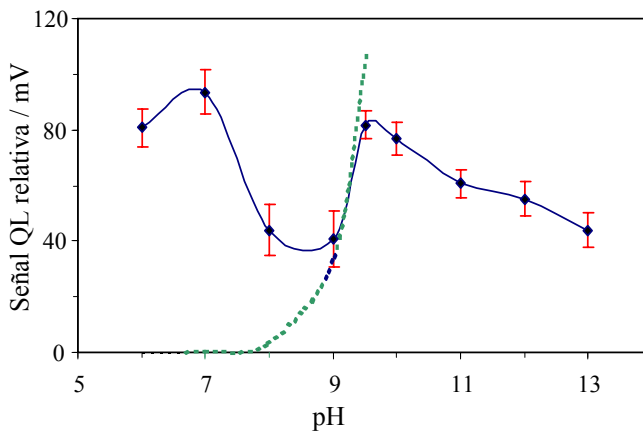


Figura 4.12 Dependencia del pH en el sensor de un solo uso.

La emisión quimioluminiscente de hipoclorito utilizando este sensor de un solo uso ocurre a un intervalo de pH comprendido entre 6,0 y 12,0, como era de esperar para un oxidante que funciona en medio alcalino. La curva de emisión quimioluminiscente con el pH muestra dos máximos, uno a pH 7,0 y otro a pH 9,5 y un mínimo entre 7,0 y 9,5. Por otra parte, hay un incremento en la emisión quimioluminiscente entre 6,0 y 7,0 y un gradual decrecimiento desde 10,0 hasta 13,0 (Figura 4.12).

Los dos máximos observados pueden ser debidos a los diferentes procesos involucrados. El primer máximo a pH 7,0 podría ser debido a una formación más eficiente del peroxiácido y esto ocurre a un pH donde el ácido carboxílico se encuentra totalmente dissociado ($pK_3 = 6,36$) y el hipoclorito está protonado ($pK_a = 7,53$) [18]. La subida de quimioluminiscencia hacia el segundo máximo se asemeja a la variación de la razón $[ClO^-]/[HClO]$ en función del pH, indicada por la línea discontinua de la Figura 4.12, y podría indicar que ambas especies del hipoclorito pueden ser efectivas en la producción de especies quimioluminiscentes. Además, la producción de oxígeno singlete por peroxiácidos esta favorecida a valores altos de pH. Un comportamiento similar ha sido descrito para la oxidación de pirogalol con hipoclorito [24]. Por lo tanto, es posible trabajar a cualquiera de los dos máximos de pH encontrados (7,0 o 9,5) pero la precisión es mayor trabajando a pH 9,5, por lo que se seleccionó este como valor óptimo.

La influencia de la fuerza iónica en la señal QL es muy grande, produciendo una disminución exponencial en la señal al aumentar la concentración de electrolito. Así, el uso de NaCl 0,01 M al pH seleccionado disminuye la señal en un 78 % (Figura 4.13). Este comportamiento está de acuerdo con los resultados encontrados para la reacción quimioluminiscente de hipoclorito con uranina [25] y rodamina 6G [16] en disolución. El pH de la muestra se ajustó a 9,5 con NaOH pero no con tampón debido a la influencia negativa de la fuerza iónica en la señal QL.

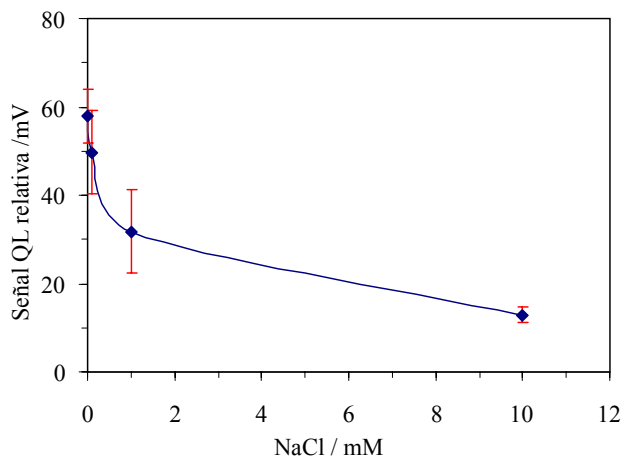


Figura 4.13 Influencia de la fuerza iónica sobre el sensor de un solo uso para una concentración de ClO^- de $3 \cdot 10^{-4}$ M.

El volumen de la muestra también afecta a la señal QL. Para este estudio se utilizaron cuatro cubetas ópticas (1, 2, 5, 10 mm) (Figura 4.14), inyectando volúmenes de 0,3, 0,7, 1,5 y 2,0 ml de manera que en todos los casos la zona sensora quedara cubierta por la disolución.



Figura 4.14 Cubetas utilizadas para la influencia del volumen de muestra.

Las señales QL se incrementaron al aumentar el volumen hasta 1,5 ml permaneciendo constantes a continuación porque el incremento de la distancia del sensor al fotomultiplicador compensa el aumento del volumen (la señal se incrementa 3,5 veces de 0,3 ml hasta 1,5 ml). En consecuencia, se utilizó una cubeta de 5 mm de paso de luz para subsiguientes experimentos.

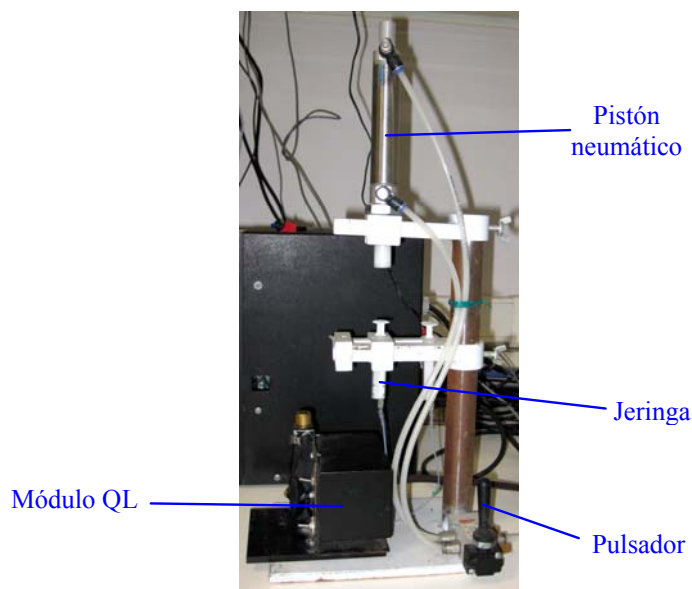


Figura 4.15 Dispositivo neumático para la introducción de la muestra.

El uso de una inyección manual con una jeringa convencional conduce a resultados de baja reproducibilidad como era de esperar (en nuestro caso se obtenía una desviación estándar relativa (DER) de un 16,0 %). Para mejorar la reproducibilidad de la inyección se diseñó un sistema automático operado neumática-

mente (2 bar) para inyectar la muestra a velocidad constante dentro de módulo externo del luminómetro mediante una jeringa convencional con lo que la DER bajó a un 6,0 % (Figura 4.15).

La respuesta del sensor de un solo uso a variaciones en la concentración de hipoclorito fue estudiada entre 10^{-5} M y 10^{-2} M a un pH de 9,5. La dependencia muestra dos tramos lineales con diferentes pendientes: un primer tramo de 10^{-5} M hasta $2 \cdot 10^{-4}$ M y un segundo entre $2 \cdot 10^{-4}$ M y $2 \cdot 10^{-3}$ M con menor pendiente. Para concentraciones más altas, la señal permanece constante. Estos resultados son similares a los que encontraron Iron y Greenway [18] en la calibración de hipoclorito utilizando rodamina 6G como reactivo en un sistema de flujo, donde observan dos tramos, exponencial el primero y lineal el segundo. Este comportamiento puede ser explicado por un mecanismo energético de asociación cooperativa que supera el problema de que una sola molécula de oxígeno singlete no tenga la suficiente energía para excitar los compuestos sensibilizadores. Este mecanismo predice una relación exponencial entre la intensidad de quimioluminiscencia y la concentración a bajos niveles de oxígeno singlete y una relación lineal a altos niveles [26], a diferencia de lo que encontramos aquí.

Observamos que estos sensores de un solo uso son reutilizables sin ninguna preparación especial excepto una breve inmersión en agua y una leve agitación para eliminar las gotas de disolución adheridas. Para concentraciones intermedias de la función de calibrado ($5 \cdot 10^{-4}$ M) se encuentra que las tiras reactivas pueden reutilizarse al menos 30 veces. Este resultado es consistente con el mecanismo propuesto ya que el ión fluoresceinato se consume en pequeñas canti-

dades durante la reacción. Teniendo en cuenta la capacidad de cambio iónico del soporte utilizado ($1,7 \mu\text{Eq}\cdot\text{cm}^{-2}$), la cantidad de anión fluoresceinato fijado en el mismo es de $15,3 \mu\text{Eq}$. Para una concentración de $5\cdot 10^{-4} \text{ M}$ de ClO^- , inyectando 1 ml, tenemos $0,5 \mu\text{Eq}$ de ClO^- , cantidad suficiente para explicar su reutilización unas 30 veces, como se observa por el resultado de la Figura 4.16.

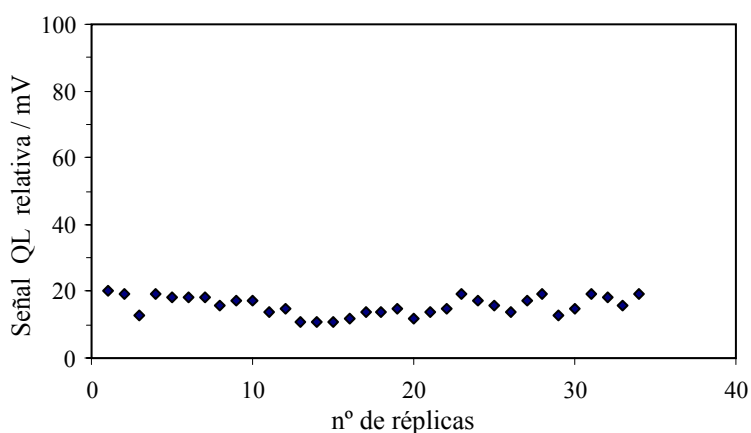


Figura 4.16 Señales de quimioluminiscencia replicadas a partir de un mismo sensor.

El tiempo de vida de los sensores de un solo uso, protegidos de la luz en las condiciones normales, fue de unos 4 meses, lo que se comprobó mediante un chequeo regular con una concentración de analito de $5\cdot 10^{-4} \text{ M}$, no mostrando cambio alguno en los valores de precisión.

4.3.4. Parámetros analíticos

Se puede emplear como señal analítica los valores de área o altura de los picos quimioluminiscentes (Figura 4.17), pero el uso de la altura produce una mayor precisión. Las funciones analíticas fueron obtenidas mediante dos conjuntos de calibración compuestos de 4 y 6 patrones con seis réplicas para cada patrón. La linealidad de las distintas funciones analíticas se comprobó con un test de fallo de ajuste. Bajo las condiciones recomendadas, se encuentran dos rangos lineales para la señal analítica, esto es, la intensidad quimioluminiscente frente a la concentración de hipoclorito, siendo el primero de 2,0 hasta 10,3 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ($4\cdot 10^{-5}$ – $2\cdot 10^{-4}$ M) y el segundo de 10,3 hasta 51,4 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ($2\cdot 10^{-4}$ – 10^{-3} M). Los límites de detección, LD, ($k=3$), y los límites de cuantificación, LQ, ($k=10$) establecidos mediante diez blancos fueron 0,4 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ($8\cdot 10^{-6}$ M) y 1,5 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ($3\cdot 10^{-5}$ M), respectivamente.

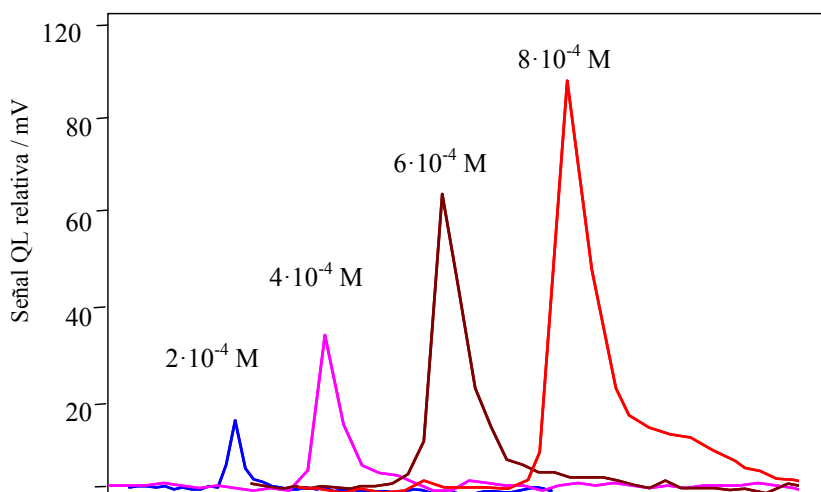


Figura 4.17 Señales QL para diferentes concentraciones de hipoclorito.

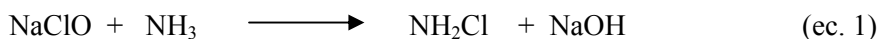
La precisión, expresada como desviación estándar relativa (DER), fue obtenida a una concentración de hipoclorito de $4 \cdot 10^{-4}$ M y utilizando el mismo sensor de un solo uso, a partir de 10 medidas replicadas, obteniendo un valor de 6,6 %. La repetibilidad utilizando diferentes sensores fue obtenida del mismo modo, utilizando la misma concentración y 10 sensores diferentes, obteniendo en este caso un valor de 12,3 %. Este valor indica que la preparación de los sensores es un factor determinante para obtener buenos resultados de reproducibilidad en el método propuesto. Por ello, consideramos que la automatización en la preparación del sensor de un solo uso con el empleo de sistemas de producción en masa para preparar los sensores puede llevar a unas mejores prestaciones analíticas. La Tabla 4.1 muestra estos y otros parámetros analíticos.

Tabla 4.1 Parámetros analíticos para la determinación de hipoclorito.

Parámetros	Valores
Primer rango lineal (M)	$4 \cdot 10^{-5} - 2 \cdot 10^{-4}$
r^2	0,995
Segundo rango lineal (M)	$2 \cdot 10^{-4} - 10^{-3}$
r^2	0,992
Límite de detección (M)	$8 \cdot 10^{-6}$
Límite de cuantificación (M)	$3 \cdot 10^{-5}$
Coste (€/sensor)	0,05
DER (%) con un sensor	6,6
DER (%) con varios sensores	12,3

Al objeto de comprobar los efectos que podrían tener especies concomitantes habitualmente presentes en aguas naturales se realizó un estudio de diferentes interferentes. Utilizando concentraciones de hipoclorito de $5 \cdot 10^{-5}$ y $5 \cdot 10^{-4}$ M se comprobó que las especies: Ca(II), Mg(II), Zn(II), Cu(II), Fe(III), Cl⁻, SO₄²⁻, CO₃²⁻, y NO₃⁻ no producían interferencia, sin embargo el amoníaco por si solo

no producía interferencia pero la adición conjunta de amoníaco y ClO^- suprimía la señal quimioluminiscente debido a la formación de cloraminas (NH_2Cl) (ecuación 1). Por otra parte, la presencia de Fe(III) o Cu(II) impide la interferencia de amoníaco por catalizar la descomposición de esas cloraminas (ecuación 2).



Por lo tanto, para la determinación de aguas residuales fue necesario adicionar sales de Fe(III) observando que en concentración 10^{-5} M era suficiente para impedir la formación de cloraminas.

4.3.5. Aplicación del sensor de un solo uso para hipoclorito

La exactitud del método se estableció mediante un estudio de recuperación en aguas de diferente grado de mineralización a las que se añadió hipoclorito a dos niveles de concentración. La Tabla 4.2 muestra los resultados de recuperación obtenidos, que oscilan entre 91,0 y 103,4 %. Para evaluar la utilidad del sensor quimioluminiscente propuesto para la determinación de hipoclorito, se aplicó a su determinación en diferentes tipos de muestras de aguas (industriales, pozo y piscinas).

Tabla 4.2 Estudio de recuperación en aguas de distinta mineralización y procedencia.

Agua mineral	Añadido mM	Encontrado mM	Recuperado %
Gerona, España (fuerte)	0,30	0,28	93,3
	0,50	0,47	95,4
Córdoba, España (débil)	0,30	0,29	98,0
	0,50	0,52	103,4
Gerona, España (débil)	0,25	0,24	97,1
	0,55	0,56	102,1
Madrid, España (muy débil)	0,30	0,29	99,7
	0,50	0,45	91,0

La Tabla 4.3 muestra los resultados obtenidos utilizando el sensor de un uso propuesto y el método de referencia espectrofotométrico (DPD) utilizado [27]. Esta tabla incluye los valores medios para tres determinaciones de cada muestra, las desviaciones estándar de estas determinaciones y el valor de probabilidad P (P_v) de comparación de resultados para ambos métodos. Como puede verse, los resultados obtenidos por ambos métodos son estadísticamente similares.

Tabla 4.3 Determinación de hipoclorito en aguas mediante el método propuesto y el de referencia.

Matriz	Tira reactiva (mg/l)	S	Referencia (mg/l)	S	P_v (%)
Agua de piscina 1	4,9	0,5	4,6	0,3	52,1
Agua de piscina 2	5,0	0,6	5,2	0,3	64,6
Agua residual 1	21	2,3	23	1,3	23,3
Agua residual 2	28	3,6	29	2,3	84,3
Agua de pozo 1	9,0	0,8	9,3	0,5	64,5
Agua de pozo 2	7	1,0	6,1	0,4	35,5

4.4. Conclusiones

En este capítulo se ha propuesto un sensor de un solo uso quimioluminiscente simple y selectivo para la determinación de hipoclorito en aguas. El sensor con-

siste en una membrana de papel de cambio aniónico en ciclo fluoresceinato fijada a un soporte alargado que se emplea además para facilitar su manejo. El sensor ofrece una buena repetibilidad, puede reutilizarse hasta 30 veces, es simple de preparar y usar, respeta al medio ambiente y puede ser considerado como una alternativa económica para obtener información analítica.

4.5. Bibliografía

1. Capitan-Vallvey, L. F.; Fernandez-Ramos, M. D. *Integrated Analytical Systems*, Alegret, S., Ed.; Elsevier Science B.V: Amsterdam, 2003; Chapter 3.
2. Hasegawa, A., Chemiluminescent analytical test strip and holder, JP 08184595 (1994).
3. Khalil, O. S., Zurek, T. F., Genger, K. R., Curtis, P. J., Jou, Y. H., Cotter, S. M., Method and apparatus for heterogeneous chemiluminescence assay, US 5,089,424 (1992).
4. Furuya, S., Imai, T., Hiratsuka, N., Ikeda, T., Kondo, A., Integral multi-layered analysis elements and their use in body fluid analysis for clinical diagnosis, JP 62103542 (1986).
5. Vogelhut, P. O., Chemiluminescent analytical device, US 4,231,754 (1980).
6. Belly, R. T., Kopcienski, M. M., Erdrich, C., Kildal, M. A., Format for immunoassay in thin film, US 5,958,339 (1999).
7. Akhavan-Tafti, H., Sugioka, K., Sugioka, Y., Reddy, L. V., Chemiluminescent detection methods using dual enzyme-labeled binding partners, US 5,843,666 (1998).

8. Liotta, L. A., Christiansen, B. C., Day, A. R., Harlacher, T., Paweletz, K., Light-emitting immunoassay, US 5,942,407 (1997).
9. Kissel, T. R., Friedman, A. E., Fingar, S. A., Chemiluminescent reagent and assay using a substituted acetanilide for light generation, US 5,705,357 (1998).
10. M.Y. Rubtsova, J.V. Samsonova, A.A. Ezhov, A.M. Egorov, Proceedings of the Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence, 12th, Cambridge (UK), April 5-9 (2002) 403.
11. M.Y. Rubtsova, C. Wittmann, A.M. Egorov, R.D. Schmid, Food Agric.Immunol. 9 (1997) 235.
12. Ramana, V. V., Yamuna, K. R., Jaunakais, I., Test strip for free chlorine analysis, US 5,491,094 (2001).
13. Wu, W. H., Elkhart, I. N., Low range total available chlorine test strip, US 5,976,823 (1999).
14. Wu, W. H., Peroxide and chlorine test strip, US 6,087,089 (2000).
15. K. Seiler, W. Simon, Anal.Chim.Acta 266 (1992) 73.
16. T. Nakagama, M. Yamada, T. Hobo, Analyst 114 (1989) 1275.
17. R. Markuszewski, H. Diehl, Talanta 27 (1980) 937.
18. G.P. Irons, G.M. Greenway, Analyst 120 (1995) 477.
19. I. Kamiya, K. Aoki, Bull.Chem.Soc.Jpn. 47 (1974) 1908.
20. I. Kamiya, S. Kato, Bull.Chem.Soc.Jpn. 43 (1970) 1287.
21. G.N. Chen, J.P. Duan, Q.F. Hu, Anal.Chim.Acta 292 (1994) 159.
22. C.B. Huang, K. Zhang, X.L. Liu, S.F. Wang, Luminescence 22 (2007) 393.
23. J. Lin, T. Hobo, Talanta 42 (1995) 1619.

24. N.P. Evmiridis, N.K. Thanasoulis, A.G. Vlessidis, *Talanta* 46 (1998) 179.
25. T. Nakagama, M. Yamada, T. Hobo, *Anal.Chim.Acta* 231 (1990) 7.
26. E.A. Ogryzlo, A.E. Pearson, *J.Phys.Chem.* 72 (1968) 2913.
27. Keith, L. H. *Compilation of EPA's sampling and analysis method*, 2nd ed.; CRC Press Inc.: Boca Raton, Florida, 2000.

Capítulo 5

***BIOSENSOR QUIMIOLUMINISCENTE DE UN
SOLO USO PARA LACTATO***

*“Duda siempre de ti mismo,
hasta que los datos no dejen lugar a dudas.”*



*Louis Pasteur (1822-1895)
Químico y Microbiólogo*

*“La ciencia no es una nación de barreras y prejuicios,
sino una puerta abierta a toda la humanidad”*



*Otto Fritz Meyerhof (1884-1951)
Premio Nobel de Medicina (1922)*

CAPÍTULO 5: BIOSENSOR QUIMIOLUMINISCENTE DE UN SOLO USO PARA LACTATO

5.1. Introducción

El L(+)-Lactato es producido por el metabolismo anaeróbico de la glucosa, descubrimiento que a Otto Fritz Meyerhof le supuso recibir el premio Nobel de medicina en 1922.

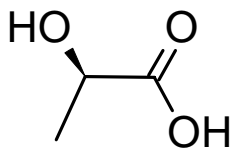


Figura 5.1 Ácido L(+)-láctico.

La determinación de lactato es de gran interés dentro del campo clínico, medicina deportiva o análisis de alimentos. La medida del mismo es llevada a cabo de forma rutinaria mediante cromatografía de líquidos [1], espectrofotometría [2] y amperometría [3], principalmente mediante electrodos enzimáticos. En los alimentos, el lactato es producido mediante fermentación bacteriana siendo un componente esencial para elaboración de queso, yogur, leche y demás productos lácteos, haciendo de la monitorización de lactato un aspecto importante para el control de la calidad.

La evaluación rápida del nivel de lactato en sangre necesaria para determinar la carga de trabajo de atletas, soldados o trabajadores o para evaluar pacientes o animales en unidades de cuidados intensivos, se puede realizar con sensores de

un solo uso [4]. Se han descrito diferentes tipos de sensores de un solo uso para lactato, y algunos de ellos están en el mercado, especialmente en el mercado deportivo, para su uso con monitores portátiles o de sobremesa tanto de pequeño como de gran formato (Figura 5.2) [5].

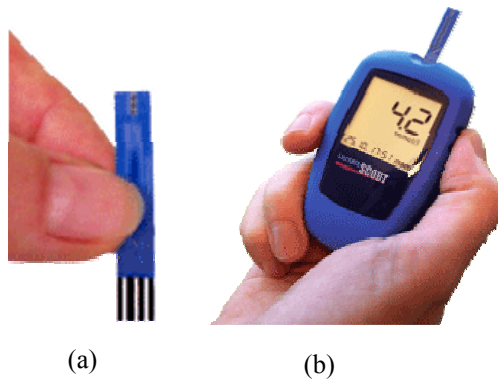


Figura 5.2 Determinación de lactato en sangre mediante el sistema Lactate Scout®; a) Sensor amperométrico; b) Instrumentación portátil.

La mayoría de los biosensores de un solo uso descritos para lactato están basados en química seca de tipo enzimático, utilizando habitualmente lactato oxidasa [6] y lactato deshidrogenasa [7] con transducción fotométrica [8] o amperométrica [9,10]. La transducción quimioluminiscente [11] comúnmente basada en esquemas enzimáticos, principalmente en lactato oxidasa/peroxidasa/luminol [12] y lactato deshidrogenasa/NADH/enzimas bioluminiscentes [13], ha sido implementadas en diferentes tipos de formatos de flujo [14,15] o fibra óptica. Sin embargo, la detección quimioluminiscente ha sido utilizada en mucha menor extensión en biosensores de un solo uso a pesar de sus ventajas, como son la alta sensibilidad e instrumentación simple, debido a la más compleja inmovili-

zación de todos los reactivos necesarios además de por la necesidad de controlar el tiempo de medida.

Los biosensores quimioluminiscentes de un solo uso descritos hasta la fecha son principalmente enzimáticos o inmunológicos y la medida de la quimioluminiscencia (QL) se lleva a cabo con luminómetros convencionales [16], luminómetros portátiles [17] o en diferentes tipos de películas fotográficas, especialmente las de tipo instantáneo [18-20], junto con un densitómetro o un escáner [21] o incluso incorporando la película fotográfica en el elemento analítico como una capa fotosensible [22].

Se han descrito diferentes sensores QL enzimáticos de un solo uso que habitualmente son elementos multicapa con los reactivos inmovilizados. Estos reactivos se pueden localizar: 1) en una sola capa de reactivo como el sensor de glucosa descrito conteniendo luminol, glucosa oxidasa y peroxidasa en una mezcla de gelatina y 1,2-bis(vinilsulfonilacetamido) etano [23] o encapsulada en microcápsulas osmosensibles para mejorar su tiempo de vida; y 2) en varias capas, como es el caso del sensor de glucosa estudiado por Carter y col. [18] basado en enzimas inmovilizadas en un disco de microfibras de vidrio y luminol en una membrana de celofán.

Como ejemplo de sensor no enzimático de un solo uso podemos destacar el sensor para la determinación de peróxido de hidrógeno en agua de lluvia basado en una membrana de hidroxietil celulosa conteniendo cloruro de cobalto como catalizador y un surfactante [24].

Diferentes ensayos quimioluminiscentes de un solo uso tanto homogéneos como heterogéneos han sido descritos incluyendo ensayos de hibridación de ADN, ensayos inmunoquímicos tales como ensayos tipo sandwich, ensayos de tipo competitivo y de tipo directo.

En el caso de ensayos heterogéneos, la separación de los compuestos marcadores no enlazados así como componentes interferentes procedentes de la muestra de la zona de reacción antes de la medida QL, se puede llevar a cabo por lavado y eliminación del líquido de lavado con una capa adsorbente adyacente. La adición de una química de detección en disolución (luminol, peróxido de hidrógeno, surfactantes, sensibilizadores) desencadena la reacción QL [16,17,25-27]. Alternativamente, después del lavado del marcador que no ha reaccionado en la membrana, se puede colocar un trozo de papel mojado con la química QL al lado de la membrana para desencadenar la emisión QL [28]. En el caso de formatos homogéneos, se ha propuesto un sensor de tres zonas. La segunda zona atrapa al ligando marcado que no ha reaccionado proveniente de la primera zona, mientras que la tercera zona contiene la química necesaria para generar la respuesta QL [29].

El empleo de estos sensores quimioluminiscentes de un solo uso es amplio y entre los ejemplos podemos citar determinaciones de peróxido de hidrógeno [24], hipoclorito [30], glucosa [18,23], teofilina [29], ametrina y los herbicidas: ácido 2,4-diclorofenoxiacético [28], atrazina, terbitilazina y ametrina [16], 4-n-nonilfenol [17], gonadotropina coriónica humana [27] y ensayos de hibridación de ADN [19,26], entre otros.

La finalidad de este capítulo es desarrollar y caracterizar un biosensor de un sólo uso para lactato, seleccionando como una aplicación interesante y representativa la determinación de lactato en productos lácteos, en este caso en yogur.

5.2. Experimental

5.2.1. Productos químicos

Todos los productos químicos utilizados fueron de calidad analítica. Las disoluciones se prepararon con agua de ósmosis inversa producida por un sistema de purificación Milli-RO 12 más Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EE.UU.). La disolución madre de L-(+)-Lactato 10^{-2} M en agua se preparó a partir de sal de litio de L-(+)-Lactato del 97 % de la casa comercial Sigma (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España) que se estandarizó mediante yodimetría. Disoluciones de menores concentraciones se prepararon mediante dilución con agua. Otras disoluciones utilizadas fueron el tampón 0,1 M Tris a partir de Trizma base 99 % (Sigma) ajustado a diferentes pH con NaOH o HCl.

La reacción QL se lleva a cabo con los siguientes reactivos: disolución madre de 10^{-2} M de luminol (5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazinediona) del 97 % (Sigma), lactato oxidasa (LOx) de *Pediococcus*, 39 IU·mg⁻¹ (Sigma), peroxidasa de *Arthromyces ramosus* (ARP), 758 IU·mg⁻¹, de Fluka (Fluka, Madrid, España) y aluminio metálico en polvo (de un tamaño de partícula < 75 µm) de Sigma.

Para la formación de membranas utilizamos hidrogeles de poliuretano D-4 y D-6, 60 g·l⁻¹, de Tyndall-Plains-Hunter Ltd. (Ringo, NY, EE.UU.); polivinil triacetato (PVA), triacetato de celulosa, el polication hidrobromuro de poli-L-lisina

(PLL) ($MW\ 84.000\ g\cdot mol^{-1}$) y el polianión poli(sodio 4-estirensulfonato) (PSS) ($MW\ 70.000\ g\cdot mol^{-1}$) 30 % en peso (densidad $1,16\ g\cdot mol^{-1}$), en disolución acuosa, todos ellos suministrados por Sigma. Como soporte para las membranas utilizamos láminas de poliéster de tipo Mylar, tanto transparentes como opacas y de distintos colores (Goodfellow, Cambridge, R.U.), así como espejos plásticos metalizados. Además de estos componentes se utilizaron disolventes como el tetrahidrofurano (THF) y las resinas de cambio aniónico Sephadex QAE-25 y DEAE, y la IRA 400 en forma de cloruro, siendo todos ellos suministrados por Sigma.

❖ *Preparación de la enzimas*

La disolución de LOx fue preparada por disolución de 1,40 mg de la misma en 1 ml de tampón Tris 0,1 M de pH 8,8 siendo conservada en tubos Eppendorf (60 μ l) a $-20\ ^\circ C$. Para la preparación de la ARP, se disolvieron 0,22 mg en 100 μ l de tampón Tris 0,1 M de pH 8,8, conservándose al igual que antes en tubos Eppendorf a $-20\ ^\circ C$.

5.2.2. Instrumentación y programas informáticos

La emisión QL fue medida mediante un luminómetro CL-1 de la casa comercial Camspec (Camspec Ltd., Cambridge, R.U.) equipado con un módulo externo para medida QL con cubetas convencionales UV-Visible previamente descritas en el capítulo anterior [30]. Este accesorio consiste en una caja metálica de forma rectangular con un soporte portacubetas en su interior. El soporte para cubetas esta fabricado en hierro pintado de negro mate y va cerrado en la parte superior mediante una tapa metálica que al cerrar activa un interruptor que pone en funcionamiento el fotomultiplicador (PMT) situado frente a la cubeta de medi-

da. Este interruptor esta diseñado para prevenir la entrada de luz exterior cuando el sistema esta abierto, así a la hora de extraer la cubeta de medida, previniendo la saturación del PMT. La tapadera presenta un orificio central donde se sitúa un tubo negro de PVC de 6 cm para introducir la muestra.

Para chequear el módulo externo se utilizó un sistema de comprobación basado en un LED. El luminómetro se conectó a un ordenador PC mediante una tarjeta de integración INT7 - 24 bit A/D para la adquisición de quimioluminiscencia y tratamiento de datos. La introducción de la muestra en el luminómetro se realizó mediante una jeringa convencional de diferentes volúmenes con ayuda de un sistema neumático de doble actuación, ya comentado previamente, diseñado por nosotros para mejorar la repetibilidad y reproducibilidad de las medidas (Figura 5.3).

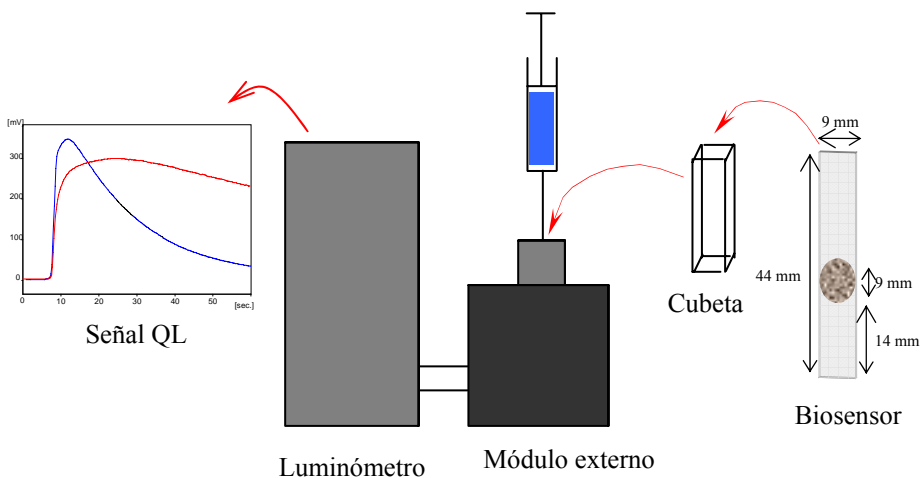


Figura 5.3 Configuración del dispositivo para la determinación de lactato.

Entre otros aparatos y materiales de laboratorio encontramos un dispositivo de recubrimiento por giro diseñado por nosotros para la preparación de membranas circulares [31], un pH-metro digital de la marca Crison con un electrodo combinado de calomelanos saturado (Crison Instruments, Barcelona, España) y cubetas de vidrio (OS) y de cuarzo (QS) de la casa comercial Hellma (Hellma Hispania, Badalona, España) (100-OS y 100-QS) de 1, 2, 5 y 10 mm de paso de luz.

Los programas informáticos empleados para el tratamiento de datos fueron: programa CSW32 suministrado por la casa DataApex Ltd. v 1.2.5 (2001) (Praga, República Checa), Statgraphics (Manugistics Inc. and Statistical Graphics Corporation, 1992, EE.UU.), ver.4.0 (1993) y Microsoft Office 2003.

5.2.3. Preparación de la membrana y los biosensores

Las membranas sensibles a lactato se prepararon a partir de un cóctel que contenía todos los reactivos químicos necesarios, cóctel que se deposita sobre un sustrato de poliéster utilizando la técnica de recubrimiento por giro. Para la preparación de este cóctel se utilizó el siguiente procedimiento optimizado: a 3,50 mg de luminol se añadieron 200 μl de $\text{NaOH } 2 \cdot 10^{-2} \text{ M}$ en un vial de cristal de 3 ml, el cual se introdujo en un baño de ultrasonidos durante 15 minutos. A continuación, se añadió al mismo vial 1.753 μl de tampón Tris 0,1 M de pH 8,8 agitándose durante 1 minuto en un mezclador. Seguidamente, se adicionaron 1,68 mg de PLL, 9 μl de la peroxidasa ARP ($15.500 \text{ IU} \cdot \text{l}^{-1}$) y 57 μl de LOx ($710 \text{ IU} \cdot \text{l}^{-1}$) agitándose un minuto después de cada adición. Finalmente se añadieron 28,6 μl de una disolución conteniendo PSS 10^{-4} M , previamente sonicada durante 5 minutos, y aluminio en polvo dispersado $2,96 \cdot 10^{-3} \text{ M}$. El vial que contenía

todos los reactivos se agita durante dos minutos almacenándose a continuación en el refrigerador a 4 °C hasta su uso.

Los biosensores de un solo uso para lactato se prepararon depositando 30 μ l de este cóctel mediante una micropipeta sobre una lámina de poliéster transparente y limpia, de dimensiones 9,0 mm x 44 mm x 0,5 mm con ayuda del dispositivo de giro ya citado rotando a 90 rpm [31] (Figura 5.4). Transcurrido un minuto, la lámina de poliéster se retira del dispositivo de giro y se seca a temperatura ambiente durante 4 horas guardándose en el refrigerador a 4 °C (Figura 5.5). El área sensora del biosensor de un solo uso esta formada por una película transparente circular de 9 mm de diámetro y con un espesor calculado de 6 μ m; el cual fue calculado suponiendo que la membrana es cilíndrica y considerando las densidades de los compuestos químicos empleados.

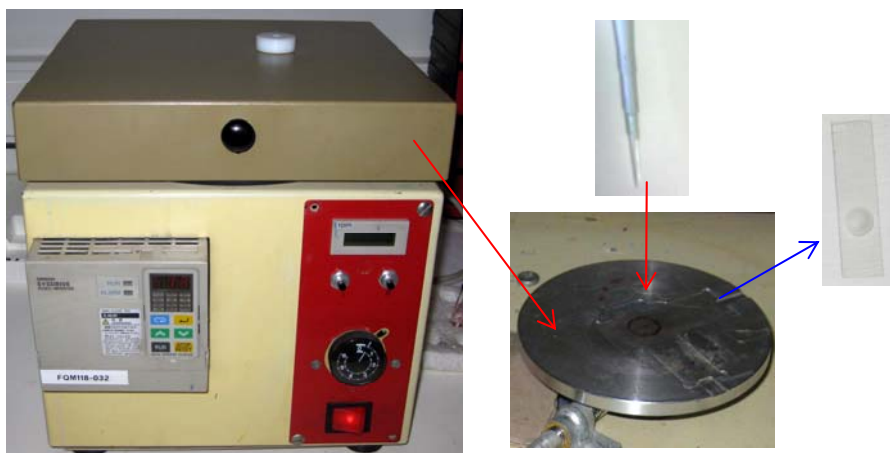


Figura 5.4 Preparación de la tira reactiva con el dispositivo giratorio.

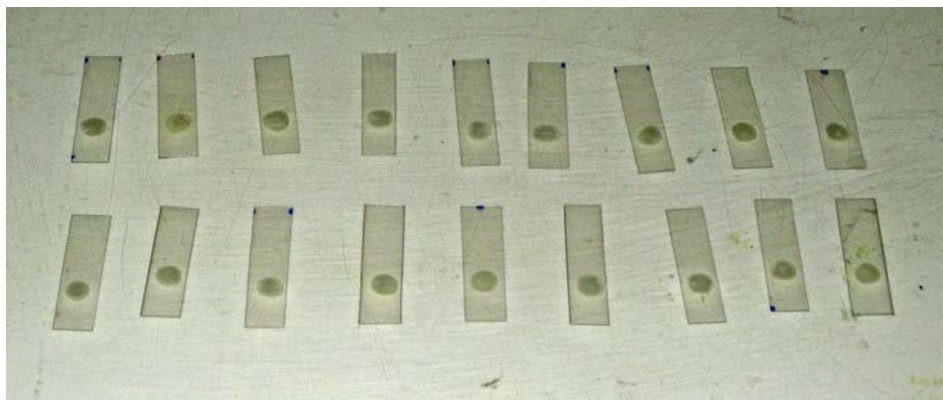


Figura 5.5 Biosensores de un solo uso para la determinación de lactato.

5.2.4. Procedimiento

❖ *Patrones y muestras*

Se toman con una jeringa de 1 ml disoluciones patrón de lactato conteniendo entre $5 \cdot 10^{-5}$ y $4 \cdot 10^{-3}$ M con el pH ajustado a 8,8 mediante tampón Tris de concentración 0,1 M. El biosensor sensible a lactato se introduce en una cubeta de vidrio de 5 mm de paso óptico, la cual se introduce en el portacubetas del módulo externo del luminómetro. Tras cerrar el dispositivo externo con su tapadera, la muestra se inyecta en la cubeta a través del tubo de PVC por medio de la jeringa actuada por un pistón neumático, midiendo la señal generada en el tiempo sin discriminación de longitudes de onda.

❖ *Referencia*

Como método de referencia se hizo uso del método enzimático Boehringer-Mannheim UV-Kit proporcionado por la casa comercial r-Bioharm AG (ATOM

S.A., Barcelona, España) [32] para la determinación de lactato en alimentos y otro tipo de muestras. La preparación de la muestra consiste en mezclar 2 g de yogur con 98 ml de agua con ayuda de una batidora eléctrica, filtrar y utilizar 0,10 ml del filtrado para el análisis.

5.2.5. Tratamiento de las muestras de yogur

Para el tratamiento de las muestras de yogur, se pesó una cantidad adecuada (generalmente 2 g), la cual es mezclada y homogeneizada con 200 ml de agua, filtrando los sólidos a través de un filtro de papel (0,217 mm de espesor y 20-25 μm de tamaño de poro) (Albet, Valencia, España). A continuación, se aplicó el método descrito previamente.

5.3. Resultados y discusión

5.3.1. Inmovilización de los reactivos de la química de reconocimiento

Este biosensor quimioluminiscente de un solo uso para lactato está basado en la oxidación atmosférica de lactato catalizada por LOx y la subsiguiente reacción del peróxido de hidrógeno con luminol en medio básico catalizada por peroxidasa. El primer paso para su estudio consiste en preparar una membrana que contenga todos los reactivos necesarios para hacer posible el reconocimiento de lactato.

Para incluir estos reactivos en la membrana, probamos diferentes sistemas de inmovilización, a saber: 1) atrapamiento utilizando hidrogeles de poliuretano D-4 y D-6, PVA y triacetato de celulosa; y 2) cambio iónico utilizando una capa compleja poliónica. Las señales relativas de QL obtenidas fueron muy diferen-

tes: PVA (0,4 %), triacetato de celulosa (1,3 %), D-6 (0,1 %), D-4 (0,8 %), y complejo poliiónico (100 %). Los mejores resultados fueron obtenidos utilizando la membrana formada por el complejo poliiónico que se forma mediante reacción del policatión lineal poli-L-Lisina (PLL), en presencia de la enzima aniónica LOx, con el polianión lineal poli-4-estirensulfonato (PSS) [33] (Figura 5.6).

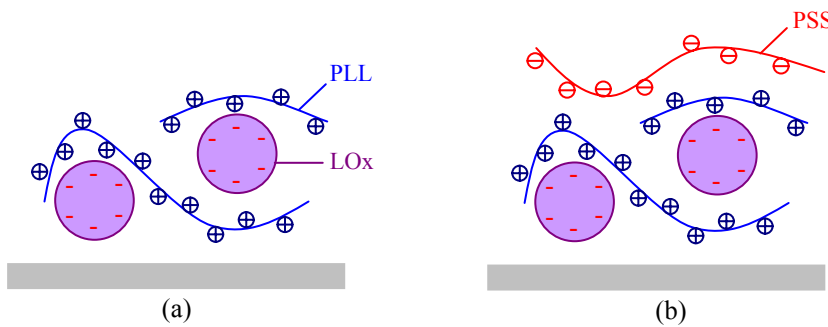


Figura 5.6 Ilustración esquemática de: (a) una mezcla del policatión (PLL) y la enzima lactato oxidasa (LOx) y (b) la membrana final obtenida por la adición del polianión (PSS) a la mezcla. Diagrama realizado a partir de Mizutani y col. [33].

Inicialmente probamos dos tipos de configuraciones para la formación de la membrana: 1) Configuración de dos membranas, con una membrana conteniendo la química de reconocimiento para lactato –LOx– y la otra conteniendo la transducción QL –ARP y luminol–; y 2) una sola membrana conteniendo todos los reactivos. Aunque ha sido descrito que la compartimentación enzimática mejora el rendimiento del sensor [34], nosotros no hemos tenido éxito en la preparación de una configuración de doble membrana utilizando el complejo poliiónico. Por consiguiente, elegimos la configuración de una sola membrana incluyendo en ella todos los reactivos.

La peroxidasa seleccionada fue la *Arthromyces ramosus* (ARP) en lugar de la habitual peroxidasa del rábano picante (HRP), debido a que es más rápida la catálisis [35] ya que la ARP enlaza luminol en sitios específicos de la molécula [36] mejorando así su actuación.

En todos los casos, las membranas fueron preparadas a partir de disoluciones de los polímeros y reactivos en un disolvente y fueron depositados sobre un soporte mediante la técnica de recubrimiento por giro. Se ensayaron además distintos tipos de soportes sólidos en los que depositar la capa sensora al objeto de incrementar la señal QL, tales como: poliésteres transparentes incoloros y diferentes poliésteres opacos coloreados así como espejos plásticos metalizados. Sin embargo, los resultados fueron muy similares en todos los casos, por lo que se escogió la tira transparente de poliéster como soporte más conveniente.

También observamos que la señal producida por la membrana sensora utilizando el complejo poliiónico es dos veces mayor que la señal producida por la misma reacción en disolución utilizando los mismos reactivos a las mismas concentraciones y con el mismo dispositivo experimental.

5.3.2. Optimización de la composición del biosensor para lactato

Una vez que los materiales de membrana fueron seleccionados, estudiamos diferentes factores relacionados con la preparación de la membrana, incluyendo la concentración de reactivos químicos y polímeros de membrana. Todos los factores se estudiaron de forma univariante. En todos los casos, el parámetro a optimizar fue la señal QL relativa, esto es, la señal quimioluminiscente de lactato (I_1) restada la señal de fondo QL (I_0) producida en ausencia de lactato.

El primer factor a considerar cuando se prepararon las membranas fue el pH del cóctel usado. Como el pH de máxima actividad enzimática para LOx (pH 7,5 [37]) y el necesario para ARP (pH 9,5 [38]) son bastante diferentes (Figura 5.7), se optó por seleccionar un pH de compromiso de 8,8, teniendo en cuenta tanto la actividad enzimática como la estabilidad. La optimización del pH de trabajo se verá posteriormente con más detalle en el apartado dedicado a las condiciones experimentales. Las concentraciones enzimáticas que se seleccionaron para realizar los estudios iniciales de acuerdo con la bibliografía consultada fueron: $15.500 \text{ IU}\cdot\text{l}^{-1}$ de ARP [37] y $140 \text{ IU}\cdot\text{l}^{-1}$ de LOx [39].

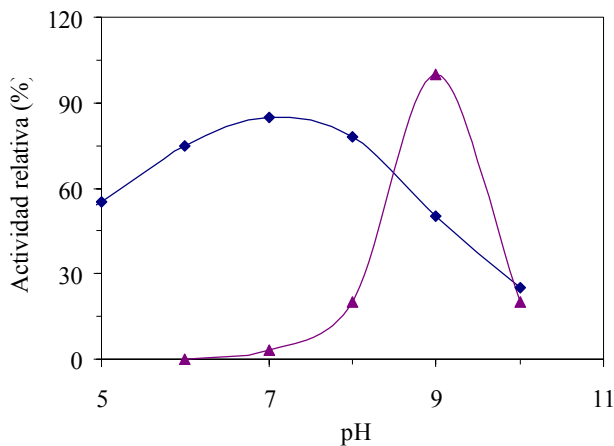


Figura 5.7 Representación de la actividad enzimática de las enzimas LOx (◆) y ARP (▲) respecto al pH. Figura compuesta a partir de los datos suministrados por Kim y col. [37] y Gu y col. [38].

❖ *Composición de la capa formada por el complejo poliiónico*

La mezcla de PSS y PLL produce un precipitado blanco el cual forma una membrana tras la evaporación del disolvente. Para encontrar la mejor composi-

ción de la membrana se estudió la influencia de la razón molar PLL:PSS sobre la señal QL.

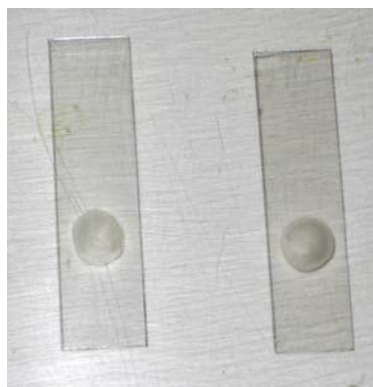


Figura 5.8 Membranas de lactato formadas con PLL y PSS.

Para la realización del estudio se prepararon dos disoluciones, una conteniendo LOx, ARP, luminol junto con PLL y otra solo PSS, con el fin de preparar diferentes membranas sobre soporte poliéster tipo Mylar mediante la mezcla de diferentes volúmenes de cada una de las disoluciones, deposición de un volumen con el dispositivo de recubrimiento por giro y medida de la señal quimioluminiscente producida tras la adición de una disolución de lactato de $4 \cdot 10^{-4}$ M. Como puede verse en la Figura 5.9, la mejor relación PLL/PSS corresponde a un valor de 0,1. Esto puede ser debido: 1) a la carga eléctrica de la membrana; así, PLL debería encontrarse en exceso para interactuar electrostáticamente con los reactivos aniónicos presentes -LOx, ARP y luminol-, y al mismo tiempo originar una membrana cargada positivamente para permitir la permeación de lactato; y 2) al espesor de la membrana, el cual se incrementa al aumentar la razón PLL/PSS ralentizando la entrada de lactato y, por consiguiente, disminu-

yendo la señal generada. El uso de relaciones PLL/PSS menores de 0,1 conduce a membranas quebradizas y peores respuestas.

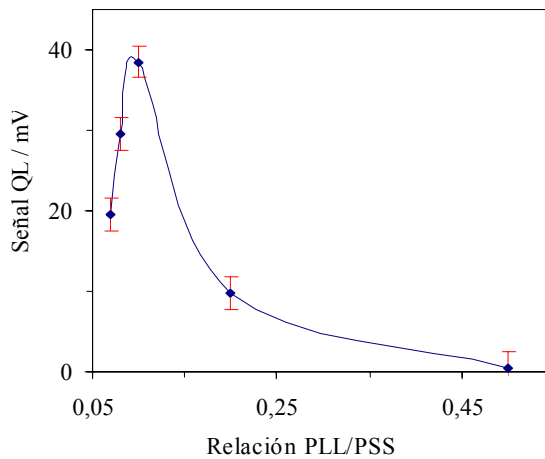


Figura 5.9 Influencia de la relación PLL/PSS sobre la QL generada (5 réplicas por punto utilizando un nuevo sensor en cada medida).

Para estudiar la dependencia del grosor de la membrana (entre 5 y 100 μm), se prepararon sensores con la relación óptima encontrada PLL/PSS de 0,1 utilizando diferentes concentraciones de estos. Se observó que cuando más alta era la concentración de los polímeros, y por tanto mayor el espesor, menor resultaba la señal relativa de QL (Figura 5.10). Se seleccionaron para la preparación de las membranas sensoras disoluciones $1,33 \cdot 10^{-5}$ M de PLL y $9,52 \cdot 10^{-7}$ M de PSS debido al incremento de la señal (13 %) y de la velocidad de respuesta observada (32 %) con respecto a los valores tomados al inicio de este estudio. A raíz de los resultados que muestra la Figura 5.10 se podría pensar que al preparar membranas con menores concentraciones de PLL y PSS se podrían originar señales

QL más altas, sin embargo el empleo de concentraciones menores a las elegidas origina membranas quebradizas que se disuelven al ponerse en contacto con el problema.

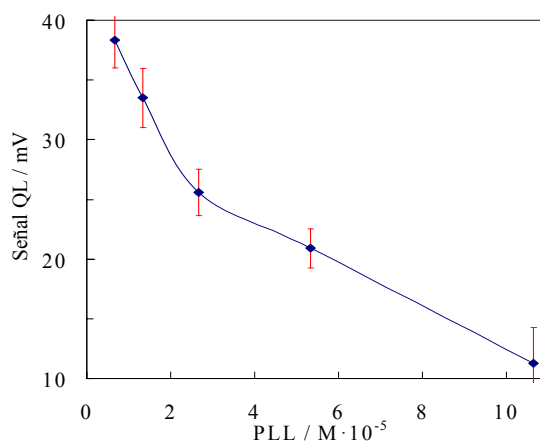


Figura 5.10 Influencia de la concentración de PLL manteniendo constante la relación PLL/PSS en 0,1.

❖ *Influencia de LOx y ARP*

Para optimizar la concentración de ambas enzimas, se prepararon biosensores de un solo uso utilizando una concentración constante de ARP de $15.500 \text{ IU} \cdot \text{l}^{-1}$ [35] y modificando la concentración de LOx entre 140 y $1.000 \text{ IU} \cdot \text{l}^{-1}$. A continuación, y una vez optimizada la concentración de LOx, se estudió la influencia de ARP entre 1.500 y $110.000 \text{ IU} \cdot \text{l}^{-1}$.

Teniendo en consideración las constantes K_m de ambas enzimas (K_m ARP: $7 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ [35], K_m LOx: $9,3 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ [38]) y la concentración de ambas enzimas ($[\text{ARP}] > [\text{LOx}]$), se confirma, considerando la ecuación de Michaelis Menten,

que LOx es el factor limitante, dando lugar con ello a un biosensor mas sensible a lactato. La Figura 5.11 muestra los resultados obtenidos para ambos enzimas.

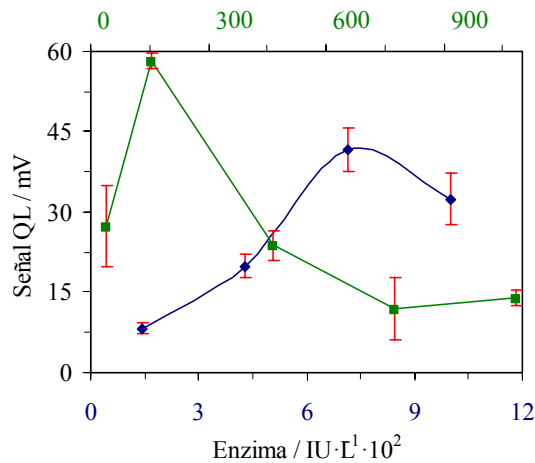


Figura 5.11 Efecto de la contribución enzimática a la señal QL relativa. Leyenda: ◆ para LOx y ■ para ARP.

La quimioluminiscencia se incrementa con la concentración de LOx hasta 710 IU·l⁻¹, manteniéndose aproximadamente a continuación debido a que hay un exceso de enzima respecto a sustrato. Para el caso de ARP, también se observa un máximo de QL pero éste decae más intensamente como consecuencia de la contribución de la señal del blanco, el cual se incrementa con la concentración de ARP, decreciendo la señal QL relativa, a causa de la reacción entre luminol y ARP [40]. La carga enzimática óptima en la membrana elegida corresponde a 0,021 IU de LOx y 0,46 IU para ARP.

❖ Dependencia del luminol

La señal QL relativa se incrementa con la concentración de luminol hasta 10^{-3} M, decreciendo suavemente después (Figura 5.12). Este decrecimiento a concentraciones mayores de luminol ha sido descrito para disolución [37,41] y justificado por Misra y col. [42] como debido a una acumulación de productos o a dismutación de productos intermedios de la reacción más que a un agotamiento de reactivos.

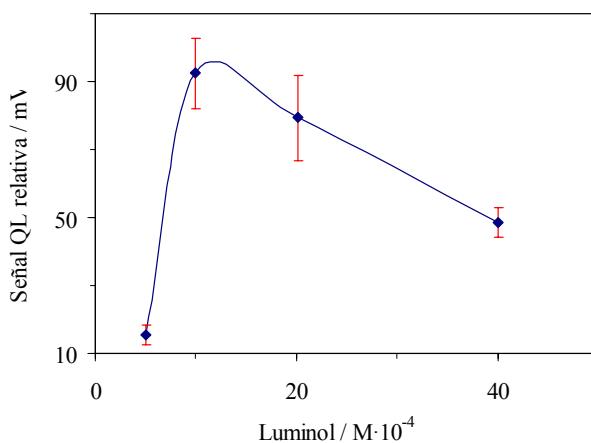


Figura 5.12 Optimización de la concentración de luminol en la membrana.

❖ *La función del aluminio*

La incorporación de aluminio metálico en polvo dentro de la membrana incrementa la señal QL relativa. Así, el uso de pequeñas cantidades de aluminio en la membrana induce a un incremento de la señal QL en más de dos órdenes de magnitud y reduce los errores experimentales sin aumentar las señales del blanco. Para optimizar el contenido de Al se prepararon diferentes biosensores conteniendo partículas de Al dispersadas (con un diámetro $< 75 \mu\text{m}$) en concentra-

ciones nominales entre $5,9 \cdot 10^{-5}$ M hasta $4,7 \cdot 10^{-4}$ M. Se observa un incremento de la señal QL con la concentración de aluminio hasta que ésta alcanza un valor de $1,2 \cdot 10^{-4}$ M (Figura 5.13), disminuyendo a continuación. Esta concentración de Al en la membrana fue la usada en posteriores experiencias, lo que significa una molalidad de $1,82 \cdot 10^{-6}$ m en la membrana sensora seca.

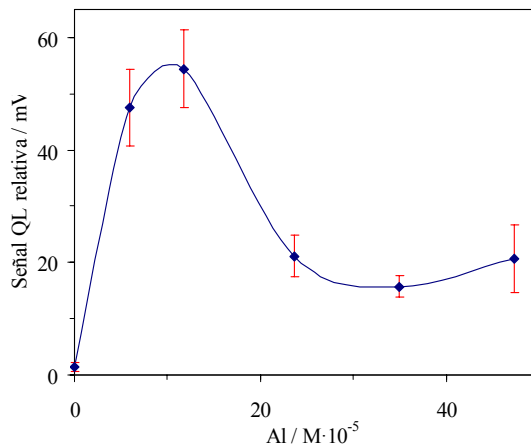


Figura 5.13 Optimización de la concentración de Al en la membrana.

A concentraciones de Al mayores que $1,2 \cdot 10^{-4}$ M, la emisión QL disminuye. En orden a aclarar este hecho se incluye la Figura 5.14, la cual muestra solo la emisión QL a altas concentraciones de aluminio y en la que los blancos no se representan aunque decrecen de la misma manera que lo hacen las señales de lactato. Es fácil comprobar que hay un cambio en el patrón de emisión junto con un progresivo decrecimiento de la emisión quimioluminiscente (Figura 5.14. curvas “a” hasta “e”) sugiriendo una contribución cada vez mayor de una de las tres reacciones que tienen lugar en el medio (conversión de lactato a piruvato

mediante LOx; reacción luminol-ARP-H₂O₂ y reacción luminol-Al-H₂O₂). La reacción que se intensifica es la reacción lenta luminol-Al-H₂O₂, como describe Kulmala [43], la cual se explicará con mayor detalle más adelante, en el apartado dedicado al mecanismo QL.

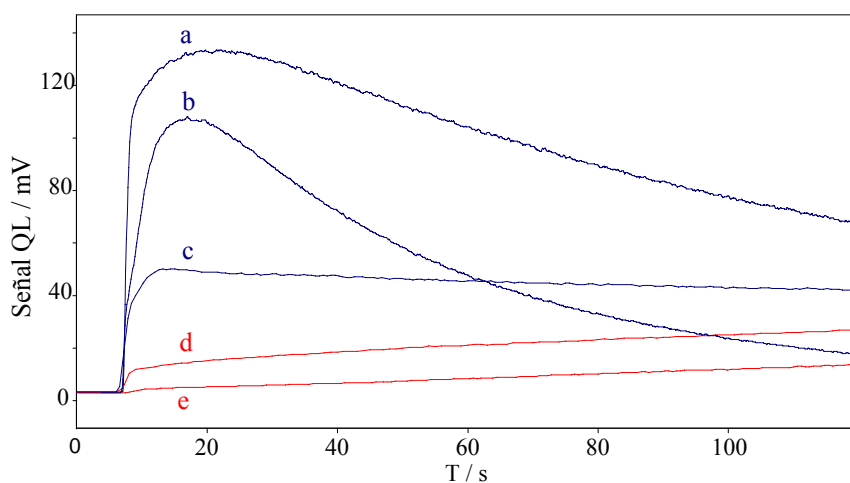


Figura 5.14 Efecto de la concentración de aluminio en la membrana sobre la emisión QL a pH 8,8. a) $1,2 \cdot 10^{-4}$ M Al; b) 10^{-3} M Al; c) 10^{-2} M Al; d) 10^{-1} M Al; e) membrana preparada en un soporte de Al. Obsérvese el cambio de comportamiento de las curvas “a” hasta “e”.

❖ Preparación del biosensor

La composición de la membrana sensora discutida anteriormente se estudió preparando biosensores con 20 μ l de cóctel con el sistema de recubrimiento por giro. El empleo de diferentes volúmenes del cóctel optimizado (10 a 40 μ l) implica un incremento de la señal QL de un 23 %, además de la mejora de la precisión ya que la desviación estándar relativa (DER) para 10 μ l (12,4 %) es mayor que para un volumen de 30 μ l (3,0 %) (Figura 5.15), lo que implica que la

DER se reduce en un 75 %. Así, se seleccionó un volumen de 30 μl para la preparación de membranas porque el uso de volúmenes superiores excedía el tamaño del soporte plástico utilizado produciendo un derramamiento del líquido.

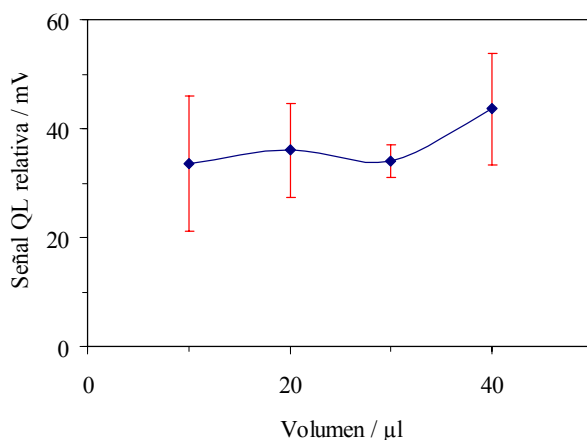


Figura 5.15 Optimización del volumen de cóctel depositado.

5.3.3. Optimización de las condiciones experimentales.

El estudio del pH (Figura 5.16.(a)) muestra un máximo de emisión quimioluminiscente a 9,5 trabajando a una concentración constante de lactato de 10^{-4} M. Sin embargo, la variación de la señal QL relativa con la concentración de lactato es muy pequeña a este pH reduciendo la discriminación entre distintas concentraciones de lactato. Además, la DER a este pH es demasiado alta (25%). El uso de pH más bajos genera menor emisión quimioluminiscente pero una mayor sensibilidad para lactato. Si tenemos en cuenta la contribución de la desviación estándar de la señal QL (ver las barras de error de la Figura 5.16.(a)) y represen-

tamos la relación señal/ruido (S/R) frente al pH, obtenemos un máximo a pH 8,8 (experiencia realizada con tampón Tris). Por ello, se seleccionó este pH como óptimo considerando tanto la sensibilidad a lactato como la relación señal/ruido (S/R), como puede apreciarse en la Figura 5.16.(b).

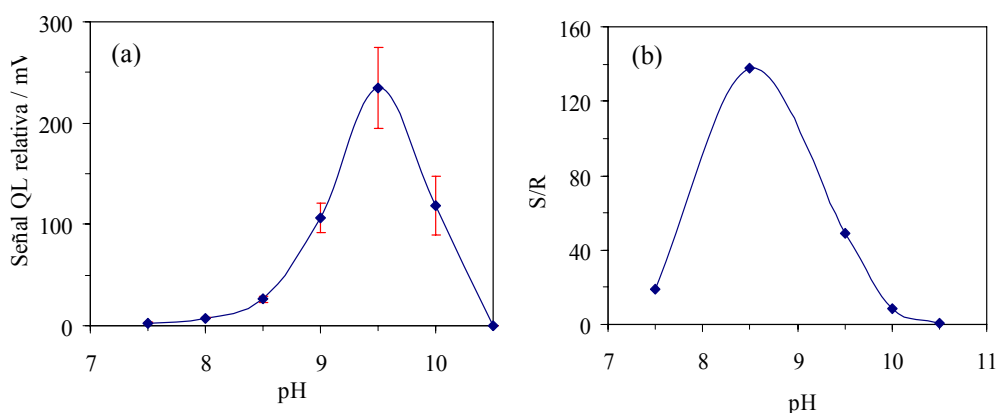


Figura 5.16 Optimización del pH. a) Variación de QL con el pH; b) Variación de la relación señal/ruido con el pH.

La explicación de la alta emisión observada a pH 9,5 tiene que ver con la elevada actividad enzimática que presenta la ARP a este pH [28,44]. Además, a este pH la producción de H_2O_2 catalizada por LOx es muy baja y, por tanto hay escasa discriminación entre concentraciones de lactato, pero la eficiencia de la reacción entre luminol-ARP es muy alta por las contribuciones de ambos componentes, cuya reactividad aumenta con el pH hasta pH 11 [37].

La dependencia de la concentración del tampón Tris en la membrana se estudió entre valores de 10^{-4} M a 0,1 M, mostrando un decrecimiento de la señal QL

relativa junto con un empeoramiento en la precisión cuando la concentración del tampón se incrementaba. Este decrecimiento ha sido descrito por Shakarov [45] trabajando con peroxidasas como ARP o HRP en disolución. Como solución de compromiso para lograr alta señal y precisión, elegimos como óptima una concentración de 10^{-2} M del tampón Tris. Análogamente, el mismo efecto es observado cuando aumenta la concentración de sales, como es el NaCl, de 10^{-4} a 0,1 M. Ambos comportamientos pueden ser explicados por el efecto de la presión osmótica; esto es, a una alta concentración de sales en la disolución problema, se reduce la entrada de lactato en la membrana poliónica, generando una débil emisión QL.

Para estudiar la influencia del volumen de muestra, se utilizaron cuatro cubetas ópticas (1, 2, 5 y 10 mm) con la membrana del biosensor situada en la cara más alejada del fotomultiplicador. Para ello, se inyectaron diferentes volúmenes de muestra, en concreto 0,3, 0,7, 1,0 y 2,0 ml, de forma que en todos los casos el biosensor fuera cubierto por la disolución. La señal QL relativa aumenta hasta un volumen de 1 ml, permaneciendo constante a mayores volúmenes ya que el incremento de distancia entre la membrana y el PMT a mayores cubetas compensa el efecto. Así, se seleccionó una cubeta de 5 mm de paso de luz para el resto del estudio. En todos los casos y para incrementar la precisión de la inyección de la muestra mediante una jeringa convencional, se incorporó un sistema automático operado neumáticamente (2 bar) [30].

La reutilización de la misma membrana con una nueva disolución de lactato dio lugar a lecturas QL decrecientes en un 25 % para cada nueva medición. Por esta razón, el biosensor solamente es apropiado para utilizarlo una sola vez.

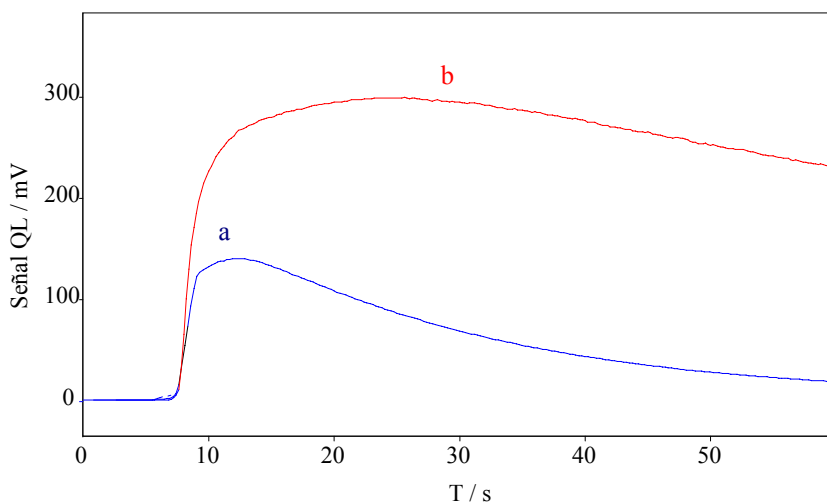


Figura 5.17 Registros QL para el biosensor de lactato correspondientes a una señal de blanco (a) y una señal de lactato (b).

5.3.4. Características de la señal quimioluminiscente

La inyección de una disolución blanco conteniendo solamente tampón Tris a pH 8,8 en una cubeta que alberga el biosensor de un solo uso, genera una emisión QL inicial (< 5 segundos) que decrece con el tiempo hasta llegar a desaparecer (Figura 5.17.a). En el caso de una disolución que contenga lactato, la señal inicial es más intensa, aunque tiene menor precisión, y se mantiene durante unos 30 segundos decreciendo a continuación más lentamente (Figura 5.17.b).

Al objeto de obtener la mejor señal QL relativa, que es la señal QL de lactato (I_1) menos la señal QL de fondo producida en ausencia de analito (I_0) (blanco), se estudió la evolución de estas señales con el tiempo en presencia y ausencia de

lactato mostrando un máximo a 30 segundos, aunque una adquisición a 2 minutos mejoraba la precisión.

5.3.5. Mecanismo Quimioluminiscente

La detección de lactato mediante la reacción quimioluminiscente del luminol consiste principalmente en dos reacciones:

1) La primera es la reacción de reconocimiento. El lactato en presencia de oxígeno y de la enzima lactato oxidasa (LOx) genera piruvato y peróxido de hidrógeno (Figura 5.18):

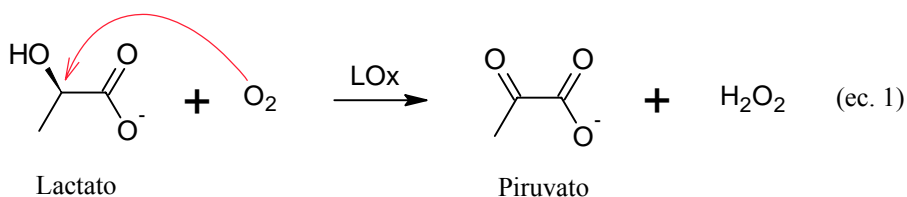


Figura 5.18 Reacción de reconocimiento de lactato.

2) Reacción de transducción. En medio básico, el H₂O₂ reacciona con luminol produciendo una emisión quimioluminiscente (Figura 5.19):

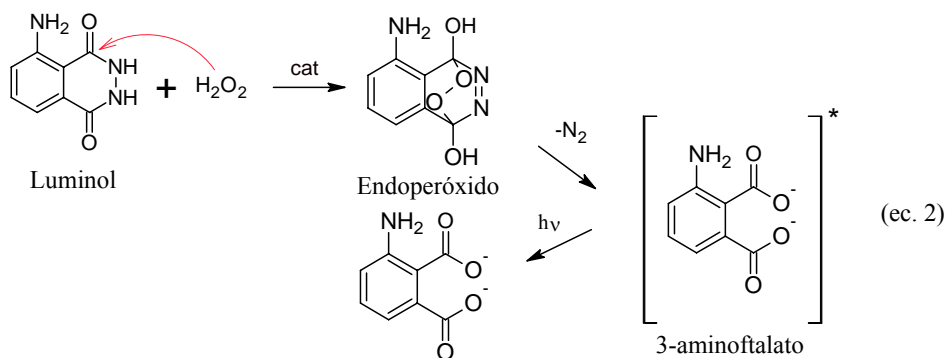


Figura 5.19 Reacción quimioluminiscente del luminol con H_2O_2 .

En esta reacción se pueden utilizar catalizadores metálicos. Sin embargo, el uso de peroxidasas, como la ARP, cataliza la oxidación de luminol a través de un mecanismo de tres pasos [37] que concluye con la formación del dianión 3-aminofthalato excitado el cual finalmente produce quimioluminiscencia al relajarse, incrementando la emisión de luz [47]. Este mecanismo consiste en que el H_2O_2 reacciona en primer lugar con la peroxidasa dando lugar a la formación de varios compuestos intermediarios denominados compuesto I y compuesto II, los cuales generan luminol radicalario (Figura 5.20). Este luminol radicalario formado reacciona entre sí con otros radicales del luminol dando lugar al derivado diazoquinona que junto con H_2O_2 genera la emisión quimioluminiscente (Figura 5.21).

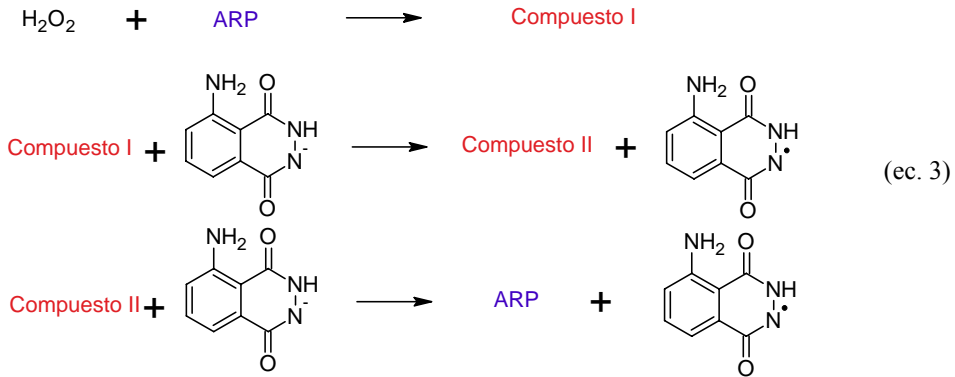


Figura 5.20 Reacción quimioluminiscente del luminol con H_2O_2 mediante catálisis de la peroxidasa ARP.

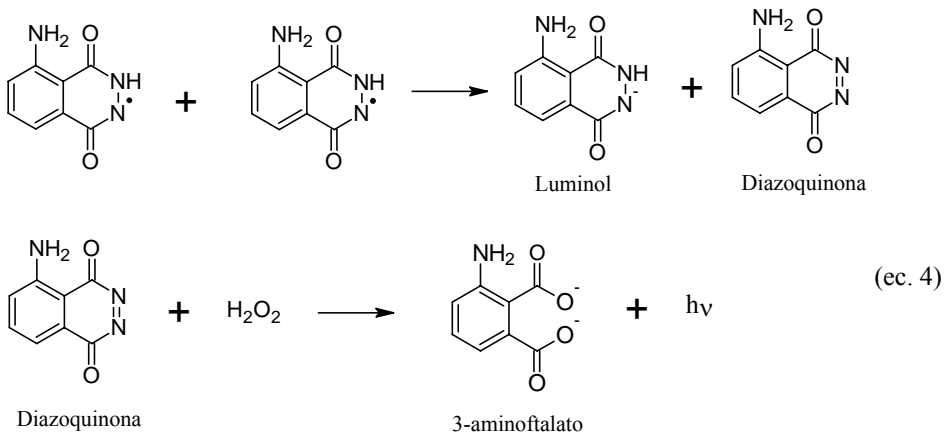


Figura 5.21 Reacción radicalaria del luminol con peróxido de hidrógeno.

Por lo tanto, cuando la membrana para lactato conteniendo luminol, LOx y ARP se pone en contacto con un tampón a pH 8,8, se observa una emisión QL inicial

que decae a una señal de estado estacionario (Figura 5.22.c). Este blanco es debido a la reacción del luminol con ARP que en presencia de trazas de oxidantes tales como el compuesto I de la ARP y/o peróxidos del luminol [40,46] generan la emisión quimioluminiscente.

La introducción de lactato en la membrana provoca la oxidación de lactato a piruvato por el oxígeno, reacción catalizada por LOx que produce H_2O_2 , el cual reacciona lentamente con luminol originando intensa emisión QL (Figura 5.22.d).

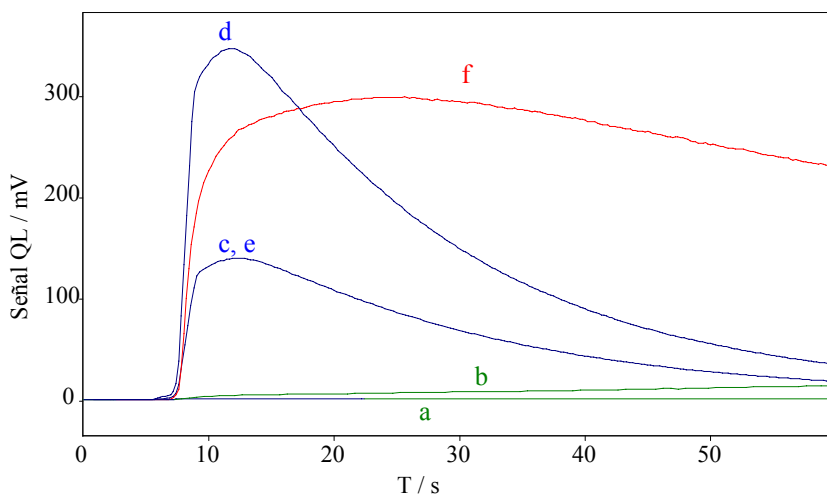


Figura 5.22 Efecto de la composición de la membrana en la emisión QL; a) membrana de Al con luminol añadiendo tampón; b) membrana de Al y luminol añadiendo lactato; c) membrana de ARP y luminol añadiendo tampón; d) membrana de ARP y luminol añadiendo lactato; e) membrana de ARP, luminol y Al añadiendo tampón; f) membrana de ARP, luminol y Al añadiendo lactato. Todas las membranas incluyen $710 \text{ IU} \cdot \text{l}^{-1}$ de LOx. En todos los casos las concentraciones fueron: Al $1,2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$; ARP $15.500 \text{ IU} \cdot \text{l}^{-1}$; luminol 10^{-3} M y lactato $6 \cdot 10^{-4} \text{ M}$.

La inclusión de aluminio metálico en polvo en la membrana sensora mejora la señal QL relativa [48]. En presencia de ARP y aluminio metálico ocurre una rápida emisión QL que se mantiene en el tiempo (Figura 5.22 f) al adicionar lactato. Este crecimiento de la emisión QL por Al podría estar relacionado con un más eficiente rendimiento de la ARP a través del reactivo intermediario (compuesto I) producido por radicales generados a partir del H_2O_2 por Al. La Figura 5.22.e muestra el efecto del aluminio en el blanco. La introducción de aluminio en el interior de la membrana no incrementa la señal de blanco porque este sólo reacciona en presencia de H_2O_2 , confirmando así la función del mismo.

En ausencia de ARP pero en presencia de Al, la emisión QL del blanco no se observa a pH 8,8 [43] (Figura 5.22.a); incluso con el H_2O_2 formado por LOx a expensas del lactato, solo se observa una débil emisión que no se puede comparar con la quimioluminiscencia en presencia de ARP (Figura 5.22.b).

5.3.6. Parámetros analíticos

La función analítica fue obtenida por medio de una calibración obtenida con 5 patrones y 5 réplicas de cada uno entre $5 \cdot 10^{-5}$ y $4 \cdot 10^{-3}$ M utilizando 30 segundos y 2 minutos (Figura 5.23, curvas g y h) como medida a tiempo fijo para la adquisición de señales QL. La dependencia observada entre la señal QL relativa y la concentración de lactato es en ambos casos (30 segundos y 2 minutos) una curva logarítmica que se linealizó aplicando logaritmos: $I = A \cdot \log[\text{lactato}] + b$. La sensibilidad se incrementa en un factor de 2,5 cuando se utiliza un tiempo de adquisición de 30 s (Tabla 5.1).

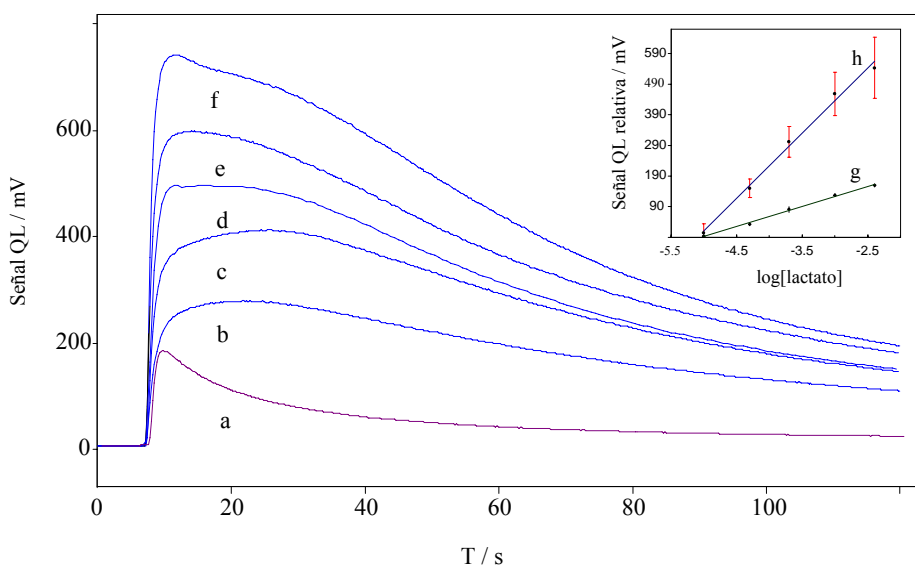


Figura 5.23 Calibración del biosensor para lactato. Las curvas indican: a) blanco; b) $2 \cdot 10^{-4}$ M; c) $6 \cdot 10^{-4}$ M; d) $8 \cdot 10^{-4}$ M; e) 10^{-3} M; f) $2 \cdot 10^{-3}$ M de lactato. La recta g indica la linealización obtenida a los 2 minutos y la recta h a los 30 segundos.

La función analítica obtenida no es muy común para sensores de lactato. Generalmente se ha descrito una función analítica lineal tanto en procedimientos FIA como SIA [18,49,50] y para sensores de fibra óptica con enzimas inmovilizados se obtiene una dependencia doblemente logarítmica [34,51].

Como la función de calibrado es logarítmica, los límites de detección se obtuvieron utilizando el criterio estándar [52] $LD = y_b + 3s_b$, donde y_b es la media de la señal del blanco y s_b es la desviación estándar del blanco, el cual fue determinado mediante la medida de diez blancos (DER 5,0 %). Los límites de detección encontrados fueron $9,2 \cdot 10^{-6}$ y $3,5 \cdot 10^{-5}$ M para un tiempo de adquisición a 2

minutos y 30 segundos, respectivamente, valores diferentes debido a los diferentes valores de precisión obtenidos en ambos casos.

Tabla 5.1 Parámetros analíticos para el biosensor de lactato.

Parámetros	Valores t = 30 s	Valores t = 2 min.
Rango lineal, M	$5 \cdot 10^{-3} - 4 \cdot 10^{-3}$	$5 \cdot 10^{-3} - 4 \cdot 10^{-3}$
Ordenada	953,1	320,1
Pendiente	168,3	65,4
R	0,971	0,998
LD, M	$3,5 \cdot 10^{-5}$	$9,2 \cdot 10^{-6}$
DER (%) blanco	10,4	5,0
DER (%) lactato*	12,3	5,5

* $8 \cdot 10^{-4}$ M

La desviación estándar relativa (DER) de la repetibilidad, obtenida utilizando biosensores de un solo uso a diferentes concentraciones de lactato, fue en torno al 3-8 % a 2 minutos y 10-15 % a 30 segundos. Teniendo en cuenta los valores de precisión, se prefirió emplear 2 minutos como tiempo de adquisición para el biosensor de lactato.

El tiempo de vida del biosensor, resguardado de la luz y protegido a 4 °C, se estudió usando una serie de biosensores y registrando su respuesta a una concentración de analito de $4 \cdot 10^{-4}$ M. El tiempo de vida obtenido fue de alrededor de un mes (Figura 5.24), siendo este un valor aceptable para este tipo de sensores y que coincide con el período de estabilidad de biosensores amperométricos de lactato estudiados por Mizutani y col. los cuales están basados en la inmovilización de la enzima LOx con la misma membrana poliónica utilizada en este

capítulo [33]. El coste del biosensor considerando solamente los reactivos y el soporte es en torno a los 0,06 € la unidad.

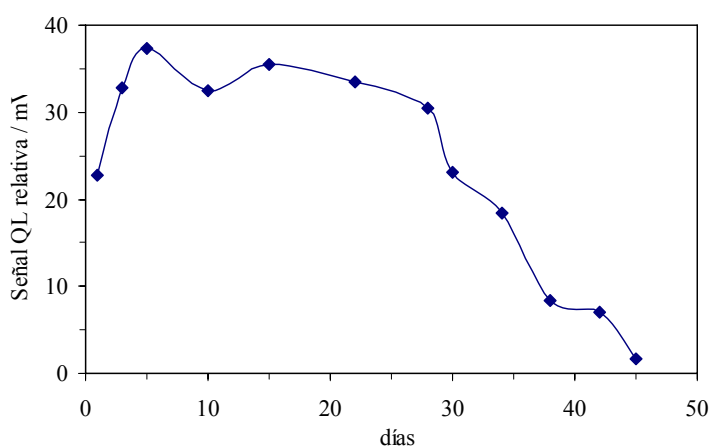


Figura 5.24 Tiempo de vida para el biosensor de lactato.

La Tabla 5.2 muestra un estudio comparativo entre el biosensor de lactato y diferentes sensores de lactato descritos en bibliografía.

Tabla 5.2 Comparación de las características de biosensores de lactato.

Sensor	Rango (M)	LD (M)	Precisión (%)	Aplicación	Ref.
QL FIA	10^{-4} - $1,5 \cdot 10^{-3}$	$1,2 \cdot 10^{-5}$	1,9	Yogur	[39]
Electrodo Amperométrico	$3 \cdot 10^{-4}$ - 10^{-3}	10^{-6}	2,0	Suero y leche	[33]
QL FIA fibra óptica	$8 \cdot 10^{-5}$ - $2,5 \cdot 10^{-2}$	$4 \cdot 10^{-5}$	1,7	Productos lácteos	[34]
Electrodo amperométrico serigráfico	10^{-6} - $5 \cdot 10^{-4}$	$5 \cdot 10^{-7}$	2,5	Productos lácteos y análisis clínico	[6]
Biosensor QL FIA	10^{-6} - 10^{-3}	$2 \cdot 10^{-7}$	1,3	Plasma y leche	[53]
Electrodo amperométrico serigráfico	$7,5 \cdot 10^{-5}$ - 10^{-3}	$5 \cdot 10^{-5}$	7,5	Vino	[9]
Electrodo de O ₂ enzimático	---	$8,6 \cdot 10^{-6}$	5	Productos lácteos y suero	[54]
FIA Amperométrico	10^{-5} - $1,8 \cdot 10^{-3}$	10^{-6}	10	Productos lácteos	[55]
FIA QL	10^{-7} - 10^{-3}	$8 \cdot 10^{-8}$	0,24	Alimentos y bebidas	[15]
Biosensor QL un solo uso	$5 \cdot 10^{-5}$ - $4 \cdot 10^{-3}$	$9,2 \cdot 10^{-6}$	5,5	Yogur	Esta Memoria

5.3.7. Aplicaciones

La viabilidad del biosensor descrito fue probada analizando lactato en diferentes muestras de yogur. Las sustancias coexistentes en este tipo de muestras que pudieran ser posibles interferentes son ácido acético, ácido cítrico, ácido ascórbico, ácido úrico y glucosa. La concentración de estos compuestos en las muestras diluidas (1/100) de yogur son aproximadamente: $5 \cdot 10^{-5}$ M de glucosa; $2,5 \cdot 10^{-6}$ M de ácido ascórbico; $1,5 \cdot 10^{-5}$ M para el resto de ácidos. Se ha comprobado que ninguno de ellos interfiere en la respuesta QL a una concentración de lactato 10^{-4} M. La selectividad de la reacción enzimática junto con la permselectividad de la capa compleja poliiónica justifica estos resultados.

El único tratamiento necesario consistió en una dilución con tampón Tris con lo que se obtiene una disolución blanca que se filtra a través de un filtro de papel Albet convencional de 20-25 μm de tamaño de poro para separar proteínas. Un pequeño volumen de esta disolución filtrada transparente, unos 2 ml, es lo necesario para realizar el análisis. Este simple tratamiento es posible considerando la características permselectivas de la membrana poliiónica, que tiene un corte de pesos moleculares de 10^3 D [33]. Los datos de la Tabla 5.3 muestran que el contenido en lactato obtenido utilizando el biosensor propuesto está en concordancia con los datos obtenidos con el método de referencia espectrofotométrico (kit Boehringer-Mannheim). Las recuperaciones obtenidas por adiciones de lactato a cada muestra de yogur se encontraron entre el 95 y el 105 %.

Tabla 5.3 Determinación de lactato en yogur.

Yogur	QL Biosensor (g/L)	Referencia (g/L)	P.C.M ^a (%)	P _v (%)
1	0,77±0,05	0,79±0,03	96,8	22,1
2	0,81±0,05	0,82±0,01	99,8	97,6
3	0,79±0,04	0,78±0,04	102,8	80,8

^a P.C.M.: porcentaje de comparación de métodos.

5.4. Conclusiones

Se ha desarrollado un biosensor quimioluminiscente de un sólo uso para lactato utilizando un sistema de reconocimiento enzimático basado en LOx y un sistema de transducción basado en luminol, ARP y aluminio metálico, todo ello inmovilizado en un soporte plástico mediante una membrana compleja poliiónica preparada a partir de PLL y PSS. Esta membrana permselectiva es adecuada para la preparación de membranas desechables transparentes para preparar biosensores de lactato de un solo uso presentando características tales como buena selectividad y respuesta rápida. El biosensor de un solo uso descrito hace posible la monitorización de lactato en múltiples situaciones prácticas. Se ha aplicado al control de lactato en yogur, con las ventajas de reducir la contaminación por uso de reactivos en disolución, una reducción del coste y de gasto de reactivos, especialmente luminol el cual no es normalmente inmovilizado en los sensores quimioluminiscentes. Respeta al medio ambiente y tiene un tiempo de vida estimado de al menos un mes si se protege de la luz en condiciones normales. Los inconvenientes están asociados a la precisión, entre un 5 y 12 % dependiendo del tiempo de adquisición utilizado, y que podría mejorarse empleando sistemas de producción en masa, con lo que se podrían recortar costes.

5.5. Bibliografía

1. J.B. Ewaschuk, G.A. Zello, J.M. Naylor, D.R. Brocks, *J.Chromatog.B* 781 (2002) 39.
2. S. Benthin, J. Nielsen, J. Villadsen, *Anal.Chim.Acta* 247 (1991) 45.
3. D. Compagnone, D. Moscone, G. Palleschi, *Recent Res.Devel.in Pure & Applied Anal.Chem.* 1 (1998) 73.
4. Capitán-Vallvey, L. F. *Encyclopedia of Sensors*, Grimes, C. A.; Dickey, E. C.Pishko, M. V., Eds.; 1 ed.; The Pennsylvania State University: 2005.
5. D.C. Klonoff, *Diabetes Tech.Therapeut.* 5 (2003) 929.
6. N.G. Patel, A. Erlenkotter, K. Cammann, G.C. Chemnitz, *Sens.Actuators B* 67 (2000) 134.
7. S.D. Sprules, J.P. Hart, R. Pittson, S.A. Wring, *Electroanal.* 8 (1996) 539.
8. Braig, J. R., Diagnostic optical biosensor for combined enzyme-spectroscopic analysis of a biological fluid, *PCT Int. Appl.*2006127724 (2006).
9. A. Avramescu, T. Noguer, M. Avramescu, J.L. Marty, *Anal.Chim.Acta* 458 (2002) 203.
10. J.M. Kauffmann, *Ann.Pharm.Fr.* 60 (2002) 28.
11. H.Y. Aboul-Enein, R.I. Stefan, J.F. Van Staden, *Crit.Rev.Anal.Chem.* 29 (1999) 323.
12. C.A. Marquette, A. Degiuli, L.J. Blum, *Appl.Biochem.Biotechnol.* 89 (2000) 107.
13. S. Girotti, S. Ghini, G. Carrea, R. Bovara, A. Roda, R. Budini, *Anal.Chim.Acta* 255 (1991) 259.

-
14. H. Nakamura, Y. Murakami, K. Yokoyama, E. Tamiya, I. Karube, M. Suda, S. Uchiyama, *Anal.Chem.* 73 (2001) 373.
 15. A. Hemmi, K. Yagiuda, N. Funazaki, S. Ito, Y. Asano, T. Imato, K. Hayashi, I. Karube, *Anal.Chim.Acta* 316 (1995) 323.
 16. Rubtsova, M. Y.; Samsonova, J., V; Ezhov, A. A.; Egorov, A. M. *Biocatalysis-2000: Fundamentals & Applications*, (2000) 33.
 17. J. Samsonova, V, M.Y. Rubtsova, M. Franek, *Anal.Bioanal.Chem.* 375 (2003) 1017.
 18. T.J.N. Carter, T.P. Whitehead, L.J. Kricka, *Talanta* 29 (1982) 529.
 19. L.J. Kricka, X. Ji, *Anal.Sci.* 7 (1991) 1501.
 20. Hasegawa, A., *Chemiluminescent analytical test strip and holder*, JP 08184595 (1994).
 21. Khalil, O. S., Zurek, T. F., Genger, K. R., Curtis, P. J., Jou, Y. H., Cotter, S. M., *Method and apparatus for heterogeneous chemiluminescence assay*, US 5,089,424 (1992).
 22. Vogelhut, P. O., *Chemiluminescent analytical device*, US 4,231,754 (1980).
 23. Furuya, S., Imai, T., Hiratsuka, N., Ikeda, T., Kondo, A., *Integral multi-layered analysis elements and their use in body fluid analysis for clinical diagnosis*, JP 62103542 (1986).
 24. A. Tahirovic, A. Copra, E. Omanovic-Miklicanin, K. Kalcher, *Talanta* 72 (2007) 1378.
 25. Kissel, T. R., Friedman, A. E., Fingar, S. A., *Chemiluminescent reagent and assay using a substituted acetanilide for light generation*, US 5,705,357 (1998).
 26. Akhavan-Tafti, H., Sugioka, K., Sugioka, Y., Reddy, L. V., *Chemiluminescent detection methods using dual enzyme-labeled binding partners*, US 5,843,666 (1998).

-
27. Belly, R. T., Kopcienski, M. M., Erdrich, C., Kildal, M. A., Format for immunoassay in thin film, US 5,958,339 (1999).
 28. M.Y. Rubtsova, G.V. Kovba, A.M. Egorov, *Biosensors Bioelectron.* 13 (1998) 75.
 29. Liotta, L. A., Christiansen, B. C., Day, A. R., Harlacher, T., Paweletz, K., Light-emitting immunoassay, US 5,942,407 (1997).
 30. J. Ballesta Claver, M.C. Valencia Miron, L.F. Capitán-Vallvey, *Anal.Chim.Acta* 522 (2004) 267.
 31. K. Seiler, W. Simon, *Anal.Chim.Acta* 266 (1992) 73.
 32. Boehringer Mannheim. Boehringer Mannheim L-lactate kit. 2006.
 33. F. Mizutani, S. Yabuki, Y. Hirata, *Anal.Chim.Acta* 314 (1995) 233.
 34. A. Berger, L.J. Blum, *Enzyme Microb.Technol.* 16 (1994) 979.
 35. T. Nakayama, T. Amachi, *J.Mol.Catal.B: Enzym.* 6 (1999) 185.
 36. M. Tanaka, K. Ishimori, I. Morishima, *Biochemistry* 38 (1999) 10463.
 37. B.B. Kim, V.V. Pisarev, A.M. Egorov, *Anal.Biochem.* 199 (1991) 1.
 38. J. Gu, P. Xu, Y. Qu, *J.Mol.Catal.B: Enzym.* 18 (2002) 299.
 39. P.B. Martelli, B.F. Reis, A.N. Araujo, M. Conceicao, B.S.M. Montenegro, *Talanta* 54 (2001) 879.
 40. E. Lissi, C. Pascual, M.D. Del Castillo, *Free Radic.Biol.Med.* 16 (1994) 833.
 41. Y. Huang, W. Liu, *J.Pharm.Biomed.Anal.* 38 (2005) 537.
 42. H.P. Misra, P.M. Squatrito, *Arch.Biochem.Biophys.* 215 (1982) 59.
 43. S. Kulmala, C. Matachescu, A. Kulmala, D. Papkovsky, M. Hakansson, H. Ketamo, P. Canty, *Anal.Chim.Acta* 453 (2002) 253.

-
44. J. Kulys, K. Krikstopaitis, S. Ebdrup, A.H. Pedersen, P. Schneider, *J.Mol.Catal.B: Enzym.* 2 (1996) 93.
 45. I.Yu. Sakharov, *Biochemistry* 66 (2008) 515.
 46. C. Pascual, M.D. Del Castillo, C. Romay, *Anal.Lett.* 25 (1992) 837.
 47. M. Nakamura, S. Nakamura, *Free Radic.Biol.Med.* 24 (1998) 537.
 48. M.J.R. Previte, C.D. Geddes, *J.Fluor.* 17 (2007) 279.
 49. A. Roda, S. Girotti, B. Grigolo, S. Ghini, G. Carrea, R. Bovara, I. Zini, R. Grimaldi, *Biosensors Bioelectron.* 6 (1991) 21.
 50. R.W. Min, J. Nielsen, J. Villadsen, *Anal.Chim.Acta* 312 (1995) 149.
 51. L.J. Blum, S.M. Gautier, A. Berger, P.E. Michel, P.R. Coulet, *Sens.Actuators B* 29 (1995) 1.
 52. Miller, N. J.; Miller, J. C. *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*, 4 ed.; Prentice Hall: Madrid, 2002.
 53. F. Wu, Y. Huang, C. Huang, *Biosensors Bioelectron.* 21 (2005) 518.
 54. M.M.F. Choi, *Food Chem.* 92 (2005) 575.
 55. F. Ghamouss, S. Ledru, N. Ruille, F. Lantier, M. Boujtita, *Anal.Chim.Acta* 570 (2006) 158.

Capítulo 6

***DESARROLLO DE UN BIOSENSOR ELECTRO-
QUIMIOLUMINISCENTE DESECHABLE PARA
LA DETERMINACIÓN DE LACTATO EN SALIVA***

“Si no se cometen errores es que no se trabaja con problemas lo suficientemente difíciles, y ése es un gran error.”



*Frank Wilczek (1951-....)
Premio Nobel de Física en 2004*

“Quien nunca ha cometido un error nunca ha probado algo nuevo”



*Albert Einstein (1879-1955)
Premio Nobel de Física en 1921*

“Un experto es aquel que ya ha cometido todos los errores posibles en una materia muy concreta”



*Niels Henrik David Bohr (1885-1962)
Premio Nobel de Física en 1922*

CAPÍTULO 6: DESARROLLO DE UN BIOSENSOR ELECTROQUIMIOLUMINISCENTE DESECHABLE PARA LA DETERMINACIÓN DE LACTATO EN SALIVA

6.1. Introducción

El desarrollo de técnicas de determinación no invasivas para la medida de metabolitos en matrices distintas de la sangre resulta de gran interés en el campo analítico, particularmente para personas que necesitan controlar frecuentemente parámetros tales como la glucemia o el lactato, y especialmente para aquellas personas que tienen problemas a la hora de realizar una extracción sanguínea [1].

El ácido láctico es producido por el metabolismo anaeróbico de la glucosa para producir energía a través de moléculas de ATP. El descenso del pH de la sangre debido a la presencia de ácido láctico puede deteriorar los músculos, razón por la cual los niveles de lactato deben ser monitorizados en pacientes que estén en cuidados intensivos, primordialmente para prevenir ataques al corazón. El análisis de lactato también es utilizado para el control de la diabetes, análisis de alimentos y la medicina deportiva para ayudar a los atletas a mejorar su entrenamiento. La determinación de lactato generalmente es llevada a cabo mediante técnicas invasivas utilizando la sangre como la muestra a analizar. De las diferentes matrices que se pueden analizar de forma no invasiva, la saliva resulta interesante debido a su alta correlación con respecto al lactato sanguíneo. Generalmente existe una relación 1:4 saliva/sangre [2], siendo la concentración de lactato en la saliva humana de alrededor de $2 \cdot 10^{-4}$ M [1].

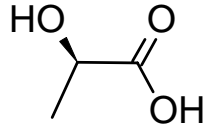


Figura 6.1 Ácido L(+)-láctico.

La estimación de los niveles de lactato en sangre se llevan a cabo utilizando diferentes tipos de monitores, desde portátiles [3] a pequeños instrumentos de sobremesa o grandes instrumentaciones utilizando una variedad de métodos distintos, incluyendo los enzimáticos y los basados en biosensores que emplean lactato oxidasa o lactato deshidrogenasa, ambas inmovilizadas, y técnicas electroquímicas y espectrofotométricas [4,5].

Se han desarrollado distintos sensores para lactato durante las últimas dos décadas, la mayoría amperométricos, los cuales se basan en el cambio en concentración de un reactivo o producto con carácter redox a través de alguna reacción enzimática específica. Se han descrito diferentes biosensores enzimáticos para lactato especialmente los basados en el citocromo b2, lactato monooxigenasa y lactato oxidasa inmovilizadas en diferentes tipos de polímeros convencionales [6], polímeros conductores [7] o nanomateriales [8]. También se han descrito para lactato diferentes tipos de sensores desechables amperométricos serigrafados y alguno de ellos están actualmente en el mercado, especialmente en el mercado de preparación física (fitness) y en la sanidad [9] (Figura 6.2).



Figura 6.2 Detectores amperométricos portátiles de lactato para fitness.

La quimioluminiscencia (QL), técnica que se caracteriza por ser versátil, práctica y con bajos límites de detección, como se ha discutido en la Introducción de esta Memoria, ha sido utilizada para el sensado de lactato a través de esquemas enzimáticos, principalmente los lactato oxidasa/peroxidasa/luminol [10] y lactato deshidrogenasa/NADH/enzimas bioluminiscentes [11], ambas llevadas a cabo en diferentes tipos de formato de flujo [12,13] o fibra óptica [10]. No obstante, la determinación quimioluminiscente ha sido escasamente utilizada en sensores desechables a pesar de sus ventajas en la sensibilidad y sencilla instrumentación requerida, debido a la necesidad de inmovilizar todos los reactivos precisos y de controlar el tiempo tras el contacto con la muestra que desencadena la emisión quimioluminiscente.

La quimioluminiscencia también se ha utilizado en diferentes tipos de sensores enzimáticos e inmunológicos de formato desechable utilizando como detectores luminómetros de sobremesa [14] o portátiles [15] o diferentes tipos de películas fotográficas [16], analizando con ellos analitos tanto orgánicos como inorgánicos [17].

La electroquimioluminiscencia (EQL), luminiscencia producida por la relajación de moléculas excitadas provenientes de una reacción iniciada electroquímicamente, es una técnica muy conveniente ya que combina la sensibilidad de las reacciones que emiten radiación con un control muy sencillo de la reacción. Por esta razón la EQL ha sido utilizada para la detección en sistemas cromatográficos, electroforéticos y en sensores, principalmente en inyección en formato de flujo y fibra óptica [18] pero escasamente en formato desechable. Blum y col. [19,20] han descrito un biosensor multiparamétrico serigrafiado, incluyendo entre otros al lactato como analito, basándose en una detección EQL a través de peróxido de hidrógeno generado enzimáticamente, biosensor que podría ser considerado como una interesante aproximación a un dispositivo desechable. La inmovilización de peroxidasas en un fotopolímero que incluye un cambiador aniónico conteniendo luminol hace posible capturar espacialmente señales EQL utilizando una cámara CCD.

El objetivos de este capítulo es el desarrollo de un biosensor desechable electroquimioluminiscente (EQL) basado en la generación de peróxido de hidrógeno por la enzima lactato oxidasa y su subsiguiente reacción con luminol oxidado electroquímicamente, a través de una celda electroquímica serigrafiada comercial, con los reactivos inmovilizados en una membrana de Methocel situada en el electrodo de trabajo y con fotomultiplicadores convencionales como sistema de detección. Además, estamos interesados en su aplicación para la determinación de lactato en saliva como ejemplo de una matriz no invasiva para monitorizar este metabolito.

6.2. Experimental

6.2.1. Productos químicos y materiales

La disolución madre de L-(+)-Lactato $10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, fue preparada a partir de su sal de litio del 97 % por Sigma (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España) a pH 9,0 mediante tampón fosfato de concentración 0,2 M. Disoluciones de menores concentraciones se prepararon mediante dilución. Como disoluciones amortiguadoras de pH se emplearon el tampón Tris (con Trizma base al 99 %) de concentración 0,5 M y el tampón fosfato (Na_2HPO_4) 0,5 M ajustados a diferentes valores de pH mediante la adición de NaOH o HCl. Otros reactivos utilizados han sido: NaCl, CaCl_2 , KCl, KSCN, NH_4Cl , ácido cítrico, úrico, ascórbico y el derivado de la celulosa, carboximetilcelulosa sódica (CMC), siendo todos ellos suministrados por la empresa Sigma.

La reacción EQL fue llevada a cabo mediante los siguientes reactivos: luminol (5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazinadiona) de concentración 10^{-2} M , lactato oxidasa (LOx) de $39 \text{ IU}\cdot\text{mg}^{-1}$ de la especie *Pediococcus* y albúmina de suero bovino en polvo al 96 % (BSA), también facilitados por Sigma. Para la preparación de membranas utilizamos cloruro de polivinilo, glutaraldehído (de grado I al 25 % p/v en agua), triacetato de celulosa (TAC), bromhidrato de poli-L-lisina (de masa molar $84.000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) y poli (sodio 4-estirensulfonato) ($70.000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) al 30 % en peso, suministrados por Sigma y Methocel[®] 90HG (hidroxipropilmetil celulosa) adquirido de Fluka. Otros reactivos adicionales fueron el disolvente tetrahidrofurano (THF); el plastificante o-nitrofenil octil éter (NPOE) y la sal de amonio cuaternario Aliquat 336, también de Sigma todos ellos. Todos los compuestos químicos utilizados fueron de calidad analítica. El agua utilizada duran-

te el estudio fue de calidad ultrapura y fue obtenida a partir de ósmosis inversa con el equipo Milli-Q Plus185 (Millipore, Molsheim, Francia).

❖ *Preparación de la enzima*

La LOx fue preparada disolviendo 1,40 mg en 1 ml de tampón fosfato pH 7,0 de concentración 0,1 M y conservada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ alicuotada en tubos Eppendorf de 60 μl .

❖ *Preparación de saliva artificial*

La saliva artificial fue preparada por mezcla de los siguientes productos químicos en las concentraciones señaladas: 5 mM de NaCl, 1 mM de CaCl_2 , 15 mM de KCl, 1 mM de ácido cítrico, 5 mM de ácido úrico, 1 mM de ácido ascórbico, 0,2 mM de lactato, 1,1 mM de KSCN, 4 mM de NH_4Cl y $10\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ de carboximetilcelulosa sódica (CMC), todos ellos disueltos en agua [21,22].

6.2.2. Instrumentación y programas informáticos

La emisión EQL fue medida utilizando un fotomultiplicador (PMT) modelo H8529, conectado mediante un puerto USB a la unidad C8855 foto-contadora, ambos de Hamamatsu Technologies (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japón). El potenciómetro utilizado fue el modelo PS-PC1 Palmsens de Ivium Technologies (Eindhoven, Holanda) junto con un conector para los electrodos serigrafados. Para la realización de las medidas EQL, hemos diseñado dos piezas de poliestireno de color negro que se pueden encajar, una que alberga el fotomultiplicador y la otra para situar el electrodo serigrafado lo más cerca posible del detector. Este dispositivo se introduce en una caja negra con orifi-

cios oscurecidos para el cableado que se conecta con el ordenador y el potenciostato. En la Figura 6.3 podemos ver como están distribuidos los diferentes elementos.

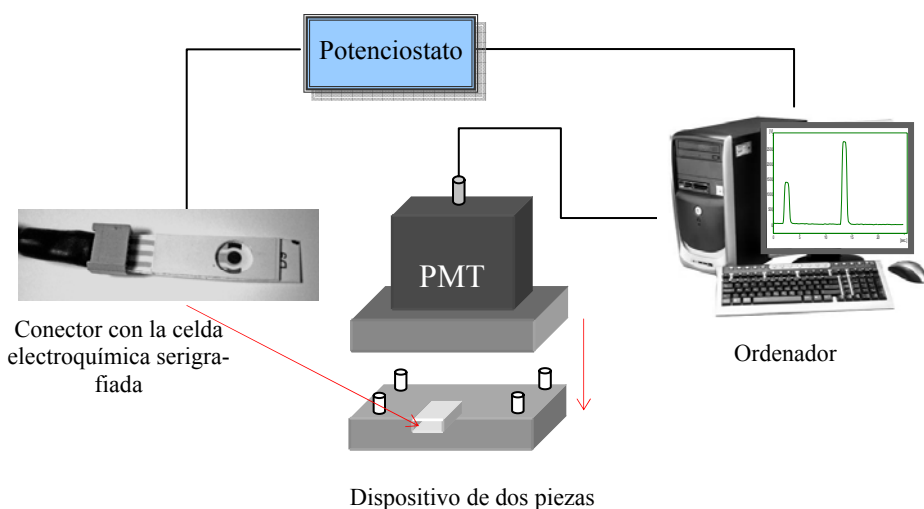


Figura 6.3 Configuración de la disposición instrumental empleada para la determinación de lactato.

Además, se hace uso de un pH-metro digital Crison (Crison Instruments, Barcelona, España) con un electrodo de calomelanos saturado y de una cámara termostática hecha a medida para poder controlar la temperatura $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ en la que se han llevado a cabo los experimentos a temperatura controlada. Los programas informáticos empleados fueron: programa CSW32 de la casa DataA-pex Ltd. versión 1.2.5 (2001) (Praga, República Checa) usado para la adquisi-

ción y manipulación de los registros luminiscentes; el programa de control del fotomultiplicador realizado en Labview por la casa Hamamatsu (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japón); el programa Palmsens-PC para controlar el potenciómetro (Palmsens Instruments BV, Holanda) y el programa estadístico para tratamiento de datos Statgraphics (Manugistics Inc. and Statistical Graphics Corporation, USA), ver. 5.0 (2000).

6.2.3. Celdas electroquímicas serigrafiadas

Las celdas electroquímicas serigrafiadas fueron suministradas por Palmsens Instruments BV. Estas celdas consisten en un electrodo de trabajo de forma circular hecho de grafito, un electrodo auxiliar también de grafito y un pseudo-electrodo de referencia de plata/cloruro de plata. Estos electrodos se serigrafian sobre un soporte plástico de 10 mm x 40 mm x 0,5 mm. Antes de ser usadas las celdas electroquímicas se comprueban mediante un test para seleccionar las que muestran un comportamiento uniforme. Además se dispuso en la zona sensora de las celdas electroquímicas serigrafiadas un pequeño receptáculo circular de unos 8 mm de diámetro para poder depositar el volumen de muestra requerido. Esto es llevado a cabo adhiriendo sobre el propio electrodo de trabajo capas sucesivas de un plástico blanco adhesivo con un orificio central de 8 mm hasta alcanzar 1 mm de espesor. En la Figura 6.4 podemos observar una celda serigrafiada comercial y una celda ya preparada con el receptáculo adherido para depositar volúmenes.

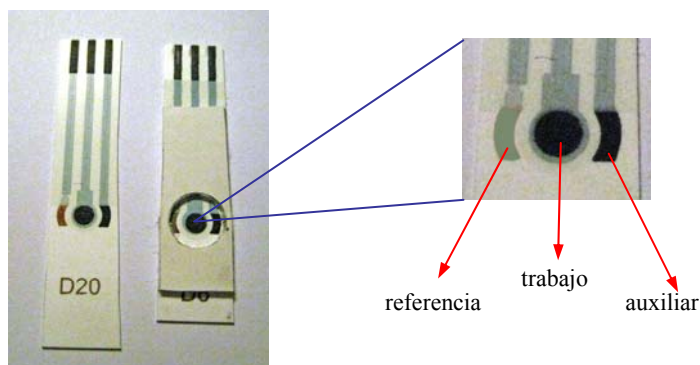


Figura 6.4 Celda serigrafiada con el receptáculo dispuesto sobre ella y los distintos electrodos.

6.2.4. Preparación del biosensor desechable

Las membranas sensibles a lactato se hicieron utilizando un cóctel preparado en un vial de cristal de 3 ml de capacidad que contenía 0,51 mg de luminol, 2,5 mg de BSA, 12,5 mg de Methocel, 50 μl de LOx de 12,5 $\text{IU}\cdot\text{ml}^{-1}$ y 200 μl de tampón fosfato de pH 8,5. El cóctel se agita y se sonica en un baño de ultrasonidos durante 10 minutos para posteriormente guardarse en el refrigerador a una temperatura de 4 $^{\circ}\text{C}$.

Seguidamente, los biosensores desechables se preparan depositando 5 μl del cóctel anteriormente preparado sobre el electrodo de trabajo de la celda electroquímica. Tras su deposición, se dejan secar a temperatura ambiente durante una hora y se almacenan en el refrigerador a 4 $^{\circ}\text{C}$ hasta su uso (Figura 6.5).

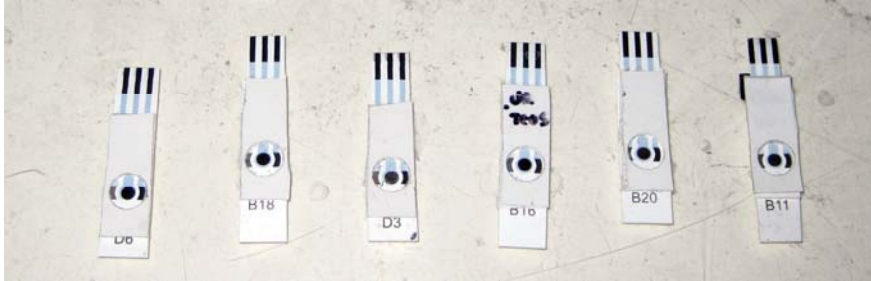


Figura 6.5 Preparación de Biosensores ECL de un solo uso para la determinación de lactato.

6.2.5. Procedimientos

❖ *Patrones*

Las disoluciones patrón de lactato conteniendo entre 10^{-5} y $5 \cdot 10^{-4}$ M se prepararon en tampón de trabajo, que consiste en tampón fosfato 0,2 M a pH 9,0 y NaCl 0,25 M.

Se depositan 50 μ l de la disolución en el receptáculo de la celda electroquímica serigrafiada situada en una de las dos piezas de poliéster negro (Figura 6.6), encajándose posteriormente la pieza que contiene el PMT. Seguidamente se aplicaron dos pulsos de 1 segundo con 10 segundos de diferencia entre pulsos a un potencial de 0,5 V obteniéndose la emisión EQL recogida por el PMT sin discriminación de longitud de onda.



Figura 6.6 Deposición de la muestra en la celda electroquímica.

❖ *Saliva*

50 μl de saliva (ver apartado 6.2.8) se depositan en la celda electroquímica aplicándose posteriormente un potencial de 0,4 V durante 4 segundos. 6 segundos mas tarde, se aplican dos pulsos de 1 s con 10 s de diferencia entre pulsos a un voltaje de 0,5 V para obtener la señal EQL. Además, la determinación de lactato en saliva necesita de la medición de un patrón interno [61] para cada muestra. Este blanco consiste en aplicar el mismo protocolo que se esta indicando en este apartado pero con un biosensor que no contenga enzima.

❖ *Método de referencia*

Se utilizó como método de referencia el kit enzimático UV-Visible Boehringer Mannheim de r-Biopharm AG (ATOM S.A., Barcelona, España) [23]. Fue

necesario introducir una etapa de centrifugación de 10 minutos a 1000 rpm y otra etapa de filtración con un filtro de jeringa de acetato de celulosa de 0,40 μm , previamente a la determinación de L-lactato en saliva ya que el kit solo señalaba directrices generales para el análisis de muestras orgánicas.

6.2.6. Tratamiento de las muestras de saliva

Las muestras de saliva analizadas provinieron de voluntarios sanos que regularmente se lavaban los dientes y se enjuagaban la boca para así minimizar la influencia de la flora microbiana y nutricional [24]. Las muestras recogidas se congelaron (-20 °C) para detener el metabolismo bacteriano, y así evitar la disminución de concentración de lactato [1]. Para el análisis de lactato en saliva humana, se tomaron 500 μl del líquido sobrenadante que queda tras descongelar y se mezclaron con 2,0 ml del tampón de trabajo. A continuación, la disolución se filtra a través de un filtro de jeringa de acetato de celulosa de 0,4 μm y se utiliza el filtrado para el ensayo. En el caso del método de referencia, es necesario realizar una centrifugación tras descongelar las muestras, aplicando a continuación el mismo procedimiento sólo que únicamente se utiliza agua para diluir las muestras.

6.3. Resultados y discusión

6.3.1. Inmovilización de los reactivos para la determinación de lactato

En este capítulo estamos interesados en la preparación de un biosensor EQL desechable para lactato basado en la oxidación atmosférica del mismo catalizada por la enzima LOx produciéndose peróxido de hidrógeno que reacciona con luminol electroquímicamente oxidado en medio básico y generando la emisión EQL correspondiente. Con este propósito se necesitan inmovilizar todos los

reactivos necesarios para hacer posible el reconocimiento de lactato y la transducción.

Para inmovilizar los reactivos, LOx y luminol, probamos diferentes métodos. Para la LOx se utilizó: 1) entrapamiento con Methocel [25], 2) cambio iónico con una capa compleja poliiónica preparada a partir de poli-L-lisina y poliestirensulfonato [26], 3) encapsulación con triacetato de celulosa (TAC) y 4) entrecruzamiento con glutaraldehído en disolución o en vapor en combinación con la BSA [27,28]. La inmovilización del luminol se realizó mediante 1) entrapamiento con Methocel, Nafion o PVC usando en este caso NPOE como plastificante y Aliquat 336 como agente formador de pares iónicos y 2) encapsulación con TAC.

Utilizando los sistemas de inmovilización anteriores se han estudiado dos tipos de configuraciones: monocapa y bicapa, tratando con esta última configuración de evitar los problemas de incompatibilidad encontrados entre reactivos, como es el caso de la inmovilización conjunta de luminol con glutaraldehído, o la inmovilización de enzimas con los reactivos QL, ya que ambos requieren condiciones diferentes tanto de pH como de biomoléculas asociadas (BSA). De las diferentes configuraciones bicapa estudiadas (Figura 6.7) solo dos ofrecieron algunos resultados al reaccionar con lactato: (a) una capa exterior formada con luminol inmovilizado en Nafion y la interior conteniendo LOx entrecruzado con glutaraldehído. La señal EQL obtenida es de un 0,5 % y (b) una capa exterior que contiene LOx inmovilizado en una membrana poliiónica y luminol en una capa interior de PVC. En este caso la señal EQL es del 0,8 %.

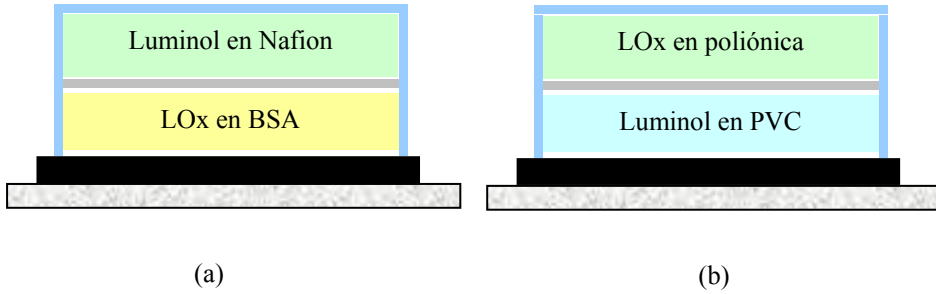


Figura 6.7 Configuración bicapa para el biosensor de lactato.

Con respecto a las configuraciones monocapa (Figura 6.8) sólo se han obtenido resultados con tres de ellas tras reaccionar con lactato: (a) una membrana de PVC conteniendo todos los reactivos, originando una señal del 0,4 %; (b) una membrana de TAC que origina un 1,3 % y (c) una membrana de Methocel que origina un 100 % de señal.

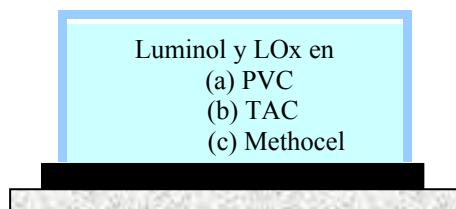


Figura 6.8 Configuración monocapa para el biosensor de lactato.

La inmovilización mediante entrecruzamiento con glutaraldehído no se puede utilizar si esta presente luminol porque entre ambos se forma una base de Schiff

que impide la oxidación del luminol y por consiguiente la emisión EQL [29]. Membranas de polímeros hidrofóbicos como PVC o TAC dan peores resultados debido a la baja actividad enzimática por parte del enzima y también por la menor entrada de lactato en la membrana. La membrana compleja poliónica podría ser utilizada para la inmovilización [14] pero ello no es posible por la poca adherencia al electrodo de trabajo, además de por la formación de membranas quebradizas. Las membranas basadas en Methocel son las que ofrecen los mejores resultados, considerando aspectos tales como adherencia, buenas propiedades eléctricas y carácter hidrofílico. Su reutilización es limitada pero esto no es un problema ya que se trabaja con el biosensor en formato desechable. Por ello, seleccionamos Methocel como polímero de entrapamiento para la preparación del biosensor EQL monocapa.

6.3.2. Optimización de la composición del biosensor para lactato

Una vez que se ha seleccionado el material de la membrana, pasamos a estudiar los diferentes factores relacionados con la formación de la membrana, incluyendo los reactivos y los polímeros de la membrana. Todos estos factores fueron estudiados de forma univariante.

❖ *Composición de la capa*

Methocel. Para optimizar la concentración de Methocel se prepararon diferentes membranas utilizando como rango de concentraciones de 8,32 a 83,2 mg·ml⁻¹. La señal EQL se incrementa con la concentración de Methocel hasta alcanzar la concentración de 49,9 mg·ml⁻¹, manteniéndose constante a mayores concentraciones (Figura 6.9).

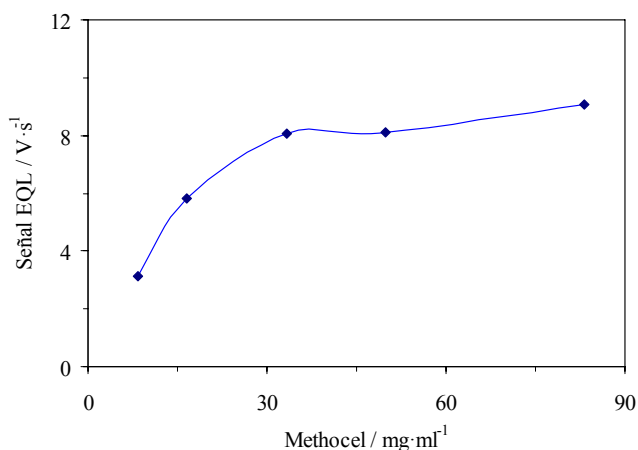


Figura 6.9 Optimización de Methocel. La señal EQL incrementa hasta alcanzar un máximo a 49,9 mg·ml⁻¹.

Esto es debido a que el Methocel, polímero acuoso constituido por hidroxipropilmetil celulosa contribuye a aumentar las propiedades eléctricas de la membrana [25,30].

pH del cóctel. Un factor importante a considerar para la preparación de la membrana es el pH. El pH para la máxima actividad enzimática de la LOx es 7,5 [31], pero como el luminol necesita medio básico para disolverse y para producir emisión EQL, se seleccionó un pH de 8,5 [32] como compromiso entre actividad enzimática y estabilidad [33]. La optimización del pH de trabajo se verá en la sección 6.3.4.

Enzima LOx. Para optimizar la concentración de la enzima, preparamos biosensores desechables con concentraciones en LOx de 3,1 a 40,0 IU·ml⁻¹, obteniendo un máximo a 12,5 IU·ml⁻¹ tal como muestra la Figura 6.10, decreciendo la señal EQL drásticamente a mayor concentración debido a existir un exceso de

la enzima con respecto al sustrato. La carga óptima enzimática en la membrana corresponde a 0,062 IU.

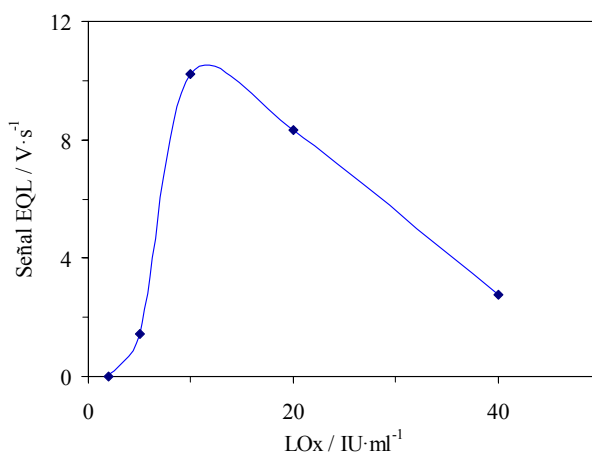


Figura 6.10 Optimización de la concentración de LOx. El máximo se produce a 12,5 IU·ml⁻¹.

Proteína BSA. La limitada estabilidad de las enzimas en membranas puede mejorarse utilizando proteínas como estabilizadores, como la BSA [34,35]. Para estudiar la influencia de la BSA, se prepararon diferentes cócteles conteniendo BSA desde concentraciones de 25 a 250 g·l⁻¹ (Figura 6.11). Estudios han sugerido que los grupos básicos portadores de pares de electrones solitarios de la BSA pueden interactuar con los protones de los grupos amino e hidrácidos del luminol [36] estimulándose el mecanismo de luminiscencia químicamente iniciada por cambio iónico intramolecular (intramolacular chemically initiated electron-exchange luminescence, CIEEL) para el luminol [37] contribuyendo a aumentar la señal. Un mayor incremento en la concentración de BSA en la

membrana hace disminuir la señal EQL, seleccionándose en consecuencia la concentración de $100 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ para la formación de membranas, lo que supone una relación en masa de 90:1 (BSA:LOx), adoptando valores habituales en la inmovilización de enzimas con BSA [38].

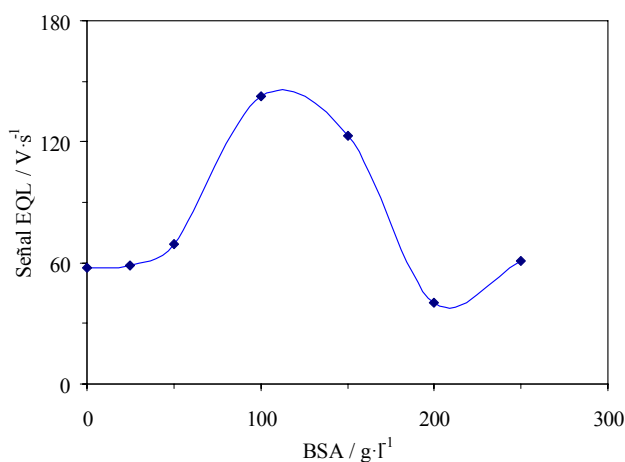


Figura 6.11 Optimización de BSA para formar la membrana. El máximo se produce a $100 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$.

Luminol. La señal EQL se incrementa con la concentración de luminol en la membrana hasta $2,9\cdot 10^{-3} \text{ M}$ (Figura 6.12), decreciendo suavemente después. Este hecho ha sido descrito para luminol en disolución [39,40] y justificado por Misra y col.[41] por la acumulación de productos o por la dismutación de productos intermedios mas que por el consumo de reactivos.

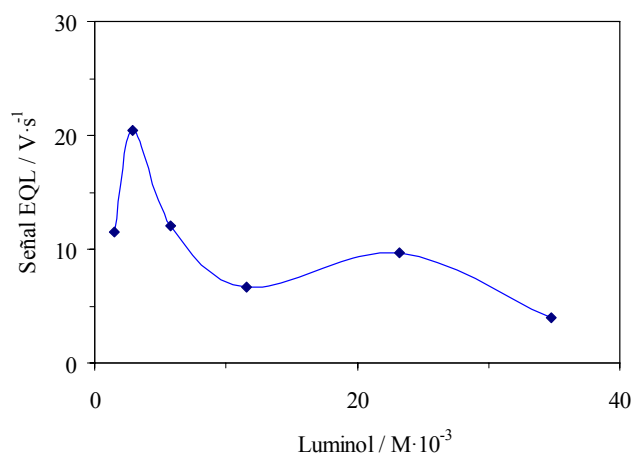


Figura 6.12 Optimización de luminol en membrana.

❖ *Volumen del cóctel*

La influencia del volumen del cóctel utilizado para preparar las membranas fue estudiada depositando en el electrodo de trabajo volúmenes crecientes de cóctel entre 5 hasta 25 μl . Los resultados muestran un progresivo decrecimiento en la señal EQL hasta el 84 % cuando el volumen se incrementa hasta 25 μl . Así, se eligieron 5 μl como volumen óptimo. La razón de este comportamiento podría estar relacionada con el incremento del grosor de la membrana que puede dificultar la introducción de lactato. Además, mayores volúmenes extienden el cóctel a los tres electrodos reduciendo drásticamente la señal EQL.

6.3.3. Condiciones electroquimioluminiscentes

❖ *Selección del voltaje*

El luminol es electroquímicamente oxidado y produce emisión de luz en disolución básica a potenciales positivos cuando el oxígeno o el peróxido de hidróge-

no están en el medio. En el caso de realizar una voltametría cíclica con luminol inmovilizado en Methocel en el electrodo de trabajo se observa una señal de oxidación electroquímica a 0,6 V (Figura 6.13).

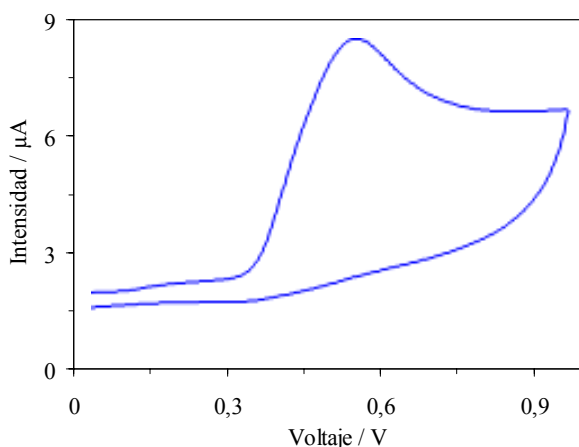


Figura 6.13 Voltamograma cíclico del luminol a 10^{-3} M de concentración.

Sin embargo, trabajando en modo cronoamperométrico, la señal EQL empieza a producirse a partir de un potencial de 0,3 V incrementándose su intensidad hasta alcanzar los 0,5 V, manteniéndose en adelante (Figura 6.14). Una ventaja de utilizar el electrodo de grafito es que el potencial de oxidación del peróxido de hidrógeno es más positivo (habitualmente 1,12 V a pH 7,4) que el del luminol, en contra de lo que ocurre con otros electrodos, como es el caso del de platino [43], en el cual el potencial de oxidación del H_2O_2 (0,7 V) está cercano al potencial de oxidación del luminol (0,5 V), dificultando la determinación electroquimioluminiscente.

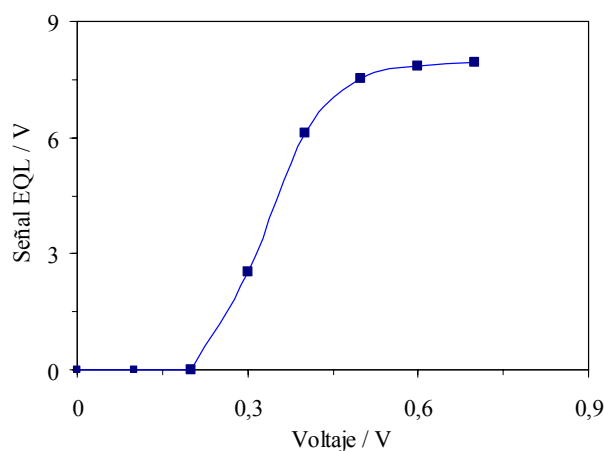


Figura 6.14 Dependencia de la señal EQL con el voltaje aplicado aplicando pulsos de 1 s para cada voltaje.

❖ *Señal EQL*

La EQL es iniciada convencionalmente utilizando diferentes técnicas electroquímicas transitorias como es la voltametría cíclica, la voltametría de pulso, la voltametría de pulso diferencial o la cronoamperometría [44]. En este caso, como la señal EQL varía con el tiempo debido a la reacción enzimática que cataliza la generación de peróxido de hidrógeno, es importante conocer el patrón de emisión con el tiempo para seleccionar las condiciones de medida. Para una cantidad fija de lactato, la señal EQL producida de pulsos sucesivos al mismo voltaje, crece con el tiempo alcanzando una meseta debido a la compensación del consumo de luminol con la producción enzimática de peróxido de hidrógeno (Figura 6.15).

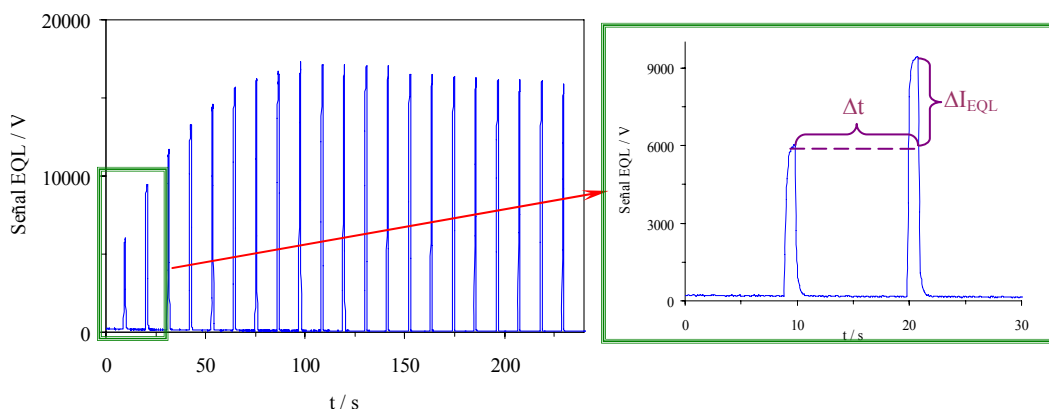


Figura 6.15 Conjunto de pulsos consecutivos de 1 s a 0,5 V aplicados cada 10 segundos. El recuadro de la derecha muestra una ampliación de los dos primeros pulsos, los cuales serán los que se utilizarán como señal analítica. Las condiciones experimentales fueron 0,2 M de tampón fosfato a pH 9,0 con 0,25 M de NaCl y $2 \cdot 10^{-3}$ M de luminol a una concentración de 10^{-4} M de lactato.

Se estudiaron varios parámetros analíticos trabajando en modo cronoamperométrico: a) usando la intensidad EQL utilizando pulsos cortos (< 5 s); b) integrando la emisión EQL a tiempos altos (> 1 min); y c) obteniendo una estimación de velocidades iniciales. Comparando valores de precisión y rangos lineales (empleando para ello el test de fallo de ajuste), el último parámetro (c) fue el que ofreció los mejores resultados.

La obtención de las velocidades iniciales para diferentes concentraciones de lactato, que obedece a una cinética Michaelis-Menten, puede estimarse más fácilmente utilizando la simplificación de dos puntos, como se muestra en la ampliación de la Figura 6.15. De esta forma no es necesario obtener las velocidades iniciales de los perfiles EQL a altos tiempos con pulsos consecutivos, sino sólo utilizando las intensidades tomadas a dos pulsos consecutivos

$\left(v_{EQL} = \frac{\Delta I_{EQL}}{\Delta t} \right)$, donde v_{EQL} viene expresada en $V \cdot s^{-1}$. Como la señal de blanco existe para nuestro sistema, la señal analítica final v_{EQL} es corregida de la forma $v_{patrón} - v_{blanco}$

❖ *Parámetros electroquímicos*

Los parámetros electroquímicos estudiados fueron: a) duración del pulso y b) intervalo de tiempo entre pulsos consecutivos. En el primer caso se estudiaron diferentes tiempos de pulso (1, 2 y 3 s) observando que cuando el tiempo del pulso se incrementa, la señal analítica v_{EQL} decrece (un 76,4 % al pasar de 1 a 3 s). Esto es debido a que cuanto mayor sea el tiempo del pulso, mayor es el consumo del peróxido de hidrógeno generado y por tanto mayor es la emisión EQL, por lo que la diferencia en intensidades (ΔI_{EQL}) al tomar el pulso siguiente es menor. Por esta razón, se eligió 1 s como tiempo óptimo del pulso. b) Se estudiaron diferentes intervalos de tiempo entre pulsos consecutivos para la adquisición de EQL, como 10, 20 y 50 s. Los resultados obtenidos (100 % para 10 s; 83,1 % para 20 s y 42,1 % para 50 s) muestran como 10 s corresponde a la mejor señal debido a la alta absorción del luminol en el electrodo de trabajo cuando los pulsos son cercanos en el tiempo [45].

6.3.4. Optimización de las condiciones experimentales

❖ *Influencia del pH*

El pH fue estudiado entre 7,0 y 11,0, trabajando a una concentración constante de lactato (10^{-4} M). La Figura 6.16.(a) muestra que existen dos máximos EQL, uno a pH 8,5 y otro a 10,5, obteniéndose un comportamiento similar al encon-

trado por Chen y col. [45], pero si se representa la relación señal/ruido (S/R), solamente aparece un máximo a pH 9,0 (Figura 6.16.(b)) decreciendo ésta después a causa del aumento de la señal del blanco con el pH y al notable crecimiento de la desviación estándar también con el pH. Por esta razón seleccionamos como pH de trabajo el de valor 9,0.

El primer máximo EQL a 8,5 se debe al compromiso existente entre la actividad enzimática de la enzima LOx (máxima a 7,5) y la reactividad del luminol, la cual incrementa con el pH [46]. El subsiguiente intenso incremento de la intensidad EQL al aumentar el pH al valor de 10,5 corresponde a una mejor formación de uno de los intermediarios, el endoperóxido, en la reacción EQL del luminol (véase más adelante la Figura 6.20). El decrecimiento a pH mayores que 10,5 se justifica por el fuerte decrecimiento del rendimiento cuántico del anión 3-aminofalato a valores de pH por encima de 11,0 [47].

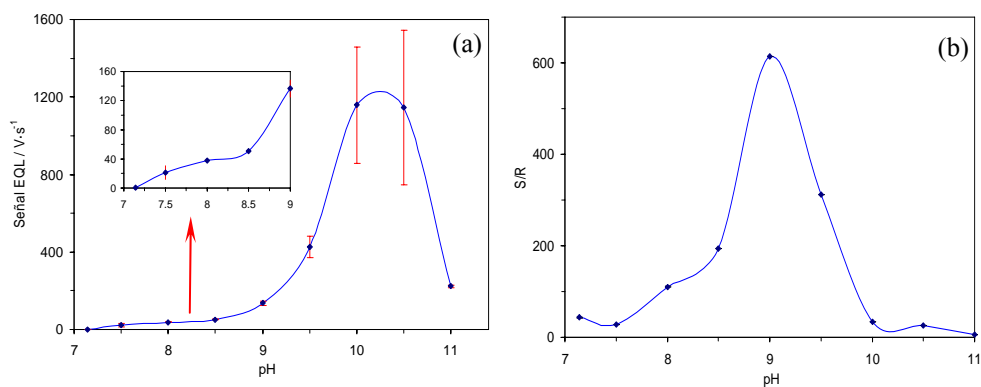


Figura 6.16 Optimización del pH para el biosensor de lactato. (a) En esta figura se muestra un máximo a pH 10,5 trabajando a concentración constante de lactato (10^{-4} M) aunque la repetibilidad disminuye cuando el pH aumenta ya que la señal del blanco se incrementa. (b) La relación S/R presenta un máximo a pH 9,0, siendo éste el escogido.

❖ *Disolución amortiguadora y contribución del electrolito*

Se estudiaron el tampón fosfato y el tampón Tris a pH 9,0, observando que el tampón Tris origina un decrecimiento de la señal EQL del 30 % respecto al tampón fosfato. La dependencia del tampón fosfato seleccionado fue estudiada en el rango de concentraciones comprendidos entre 0,05 y 0,8 M, encontrándose un máximo EQL a 0,2 M y mostrando un paulatino decrecimiento posteriormente a mayores concentraciones. Este comportamiento puede ser debido a un efecto de presión osmótica que disminuye la entrada del lactato en la membrana, disminuyendo la emisión EQL.

La presencia de un electrolito es necesaria para incrementar la conductividad de la membrana y la resolución de los picos EQL [48], originando unos picos de emisión muy definidos, especialmente si se trabaja en modo voltametría cíclica. Por lo tanto, se prepararon diferentes concentraciones de NaCl entre 0,12 a 2,0 M, obteniendo un máximo a 0,25 M (Figura 6.17). La emisión EQL debería ser constante a mayores concentraciones de NaCl, ya que el electrolito solo contribuye a la conductividad de la membrana, pero sin embargo disminuye debido a la ruptura de la gelificación del Methocel, dificultando la formación de la membrana en el electrodo de trabajo.

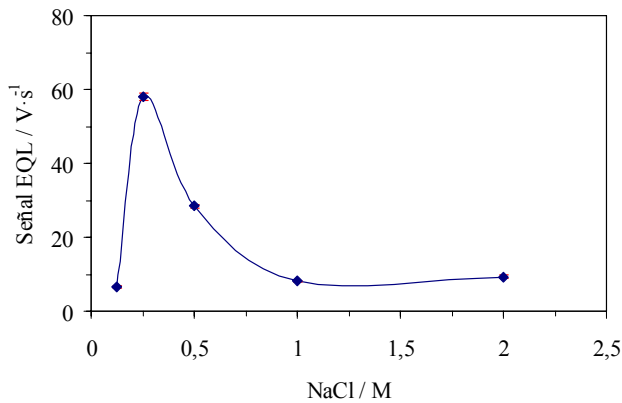


Figura 6.17 Optimización de NaCl en la membrana.

❖ *Volumen de muestra*

El volumen de la muestra que se puede poner en el receptáculo del biosensor también fue estudiada, observándose que la señal EQL aumenta cuando el volumen lo hace. Un incremento de 10 a 50 μl supone un crecimiento del 71,9 %, porque un mayor volumen contribuye a que el PMT se sitúe más cerca de la superficie emisora del biosensor. Volúmenes mayores (60 μl) provocan un decrecimiento de la señal, probablemente por la dispersión causada por el efecto lente que presenta la gota depositada. Seleccionamos por tanto 50 μl como volumen óptimo de muestra ya que es la máxima capacidad que presenta el receptáculo del biosensor.

❖ *Temperatura*

La temperatura afecta tanto a la reacción enzimática [31] como a la reacción del luminol [49], siendo más pronunciado el efecto de la reacción enzimática. La señal EQL de este biosensor se incrementa con la temperatura a una media de

$2,6 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ por grado centígrado. La temperatura seleccionada de trabajo (Figura 6.18) corresponde a temperatura ambiente ($20\text{-}25 \text{ }^\circ\text{C}$) debido a que supone tener unas condiciones de análisis más simples ya que a esta temperatura el sistema presenta suficiente sensibilidad para la determinación de lactato.

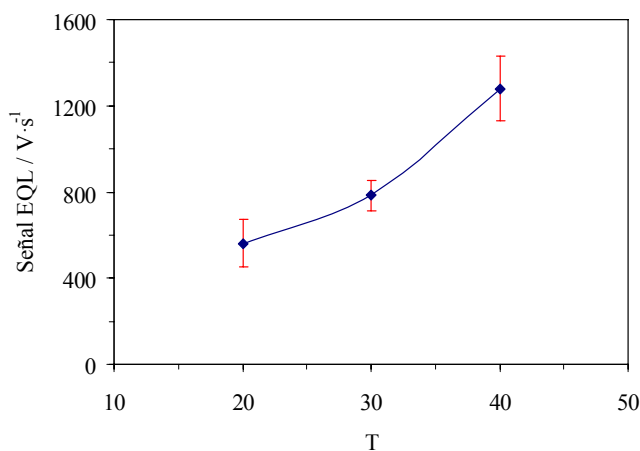


Figura 6.18 Efecto de la temperatura sobre el biosensor EQL de lactato.

6.3.5. Mecanismo EQL

En medio básico, el luminol está en forma aniónica y es electroquímicamente oxidado a diazoquinona al aplicar $0,5 \text{ V}$ a la celda serigrafada de grafito.

El peróxido de hidrógeno producido mediante la oxidación atmosférica del lactato por la catálisis de la enzima LOx (Figura 6.19) reacciona con la diazoquinona dando lugar al anión 3-aminofталato en estado excitado, cuya desactivación causa una emisión luminiscente (Figura 6.20) [19,50].

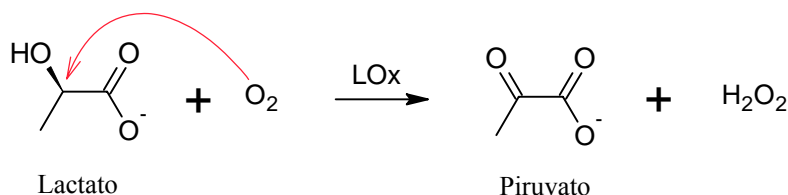


Figura 6.19 Reacción de reconocimiento de lactato.

Cuanto más alcalino sea el medio, mayor es la emisión EQL debido al incremento de la desprotonación del luminol [43,51], como puede observarse en la Figura 6.16.(a). El papel del peróxido de hidrógeno consiste en participar como anión peróxido HO₂⁻ o como radical superóxido O₂^{-*}, siendo este último formado mediante oxidación electroquímica, en la reacción con el luminol oxidado electroquímicamente (Figura 6.20) [52]. En ausencia de lactato se observa una señal de blanco que empieza a crecer conforme aumenta el pH de 9,0 a 10,5 (aumento que corresponde a 206,3 V·s⁻¹ por unidad de pH). La señal del blanco se debe a la reacción entre el luminol oxidado con el oxígeno disuelto y también a la más eficiente producción de aniones 3-aminofalato excitados [46]. Así, la cuantificación de lactato debe desarrollarse en condiciones débilmente básicas para que este fondo debido al blanco no origine una mayor imprecisión; en concreto, se observa un 4,5 % de desviación estándar relativa (DER) a pH 9,0 y un 34,8 % a pH 10,5.

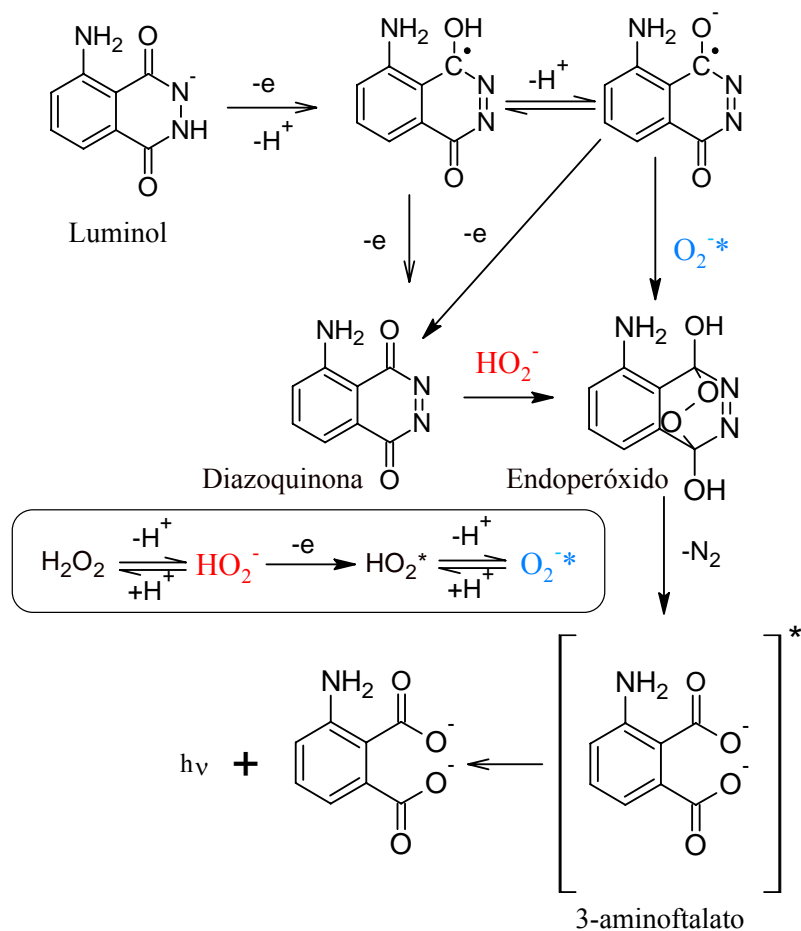


Figura 6.20 Mecanismo de la EQL de luminol con peróxido de hidrógeno.

6.3.6. Parámetros analíticos

La función analítica fue obtenida por medio de una calibración obtenida a partir de 6 patrones con 5 réplicas por cada patrón con concentraciones que van desde 10^{-5} hasta $4 \cdot 10^{-3}$ a un pH de 9,0. El comportamiento logarítmico obtenido (Figura 6.21) fue linealizado utilizando una función doble logarítmica (Figura 6.22):

$\log v_{\text{EQL}} = a \cdot \log [\text{lactato}] + b$. Esta función analítica es comúnmente utilizada en biosensores enzimáticos EQL [19].

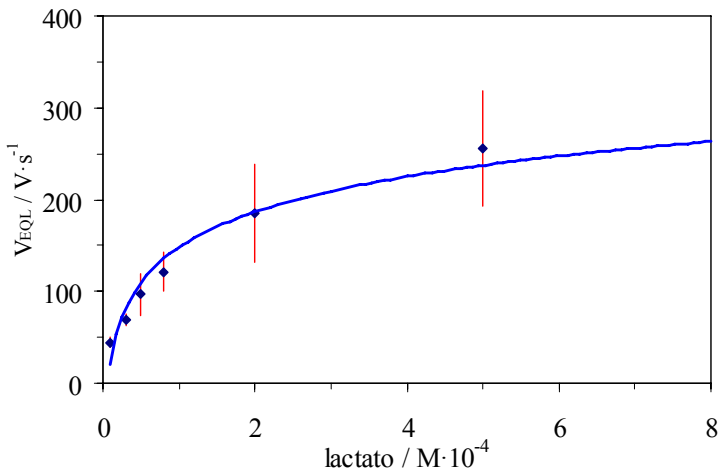


Figura 6.21 Representación gráfica de patrones de lactato presentando comportamiento logarítmico.

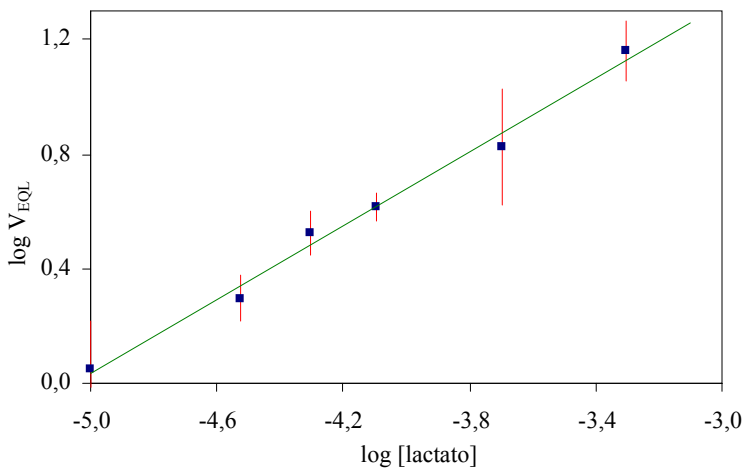


Figura 6.22 Calibración log-log para lactato utilizando 5 réplicas por concentración.

Como la función de calibrado es logarítmica, el límite de detección LD fue obtenido utilizando el criterio estándar [53] según $LD = y_b + 3s_b$, donde y_b es la media de 10 blancos realizados con diferentes biosensores y s_b es la desviación estándar (DER 5,13 %). El LD encontrado utilizando este criterio es de $5 \cdot 10^{-6}$ M. La repetibilidad, expresada como DER de la concentración de lactato, fue estudiada de dos maneras: a) utilizando un conjunto de 10 biosensores diferentes trabajando a tres concentraciones de lactato dentro del rango analítico (DER 3-5 %); y b) utilizando 10 veces la misma celda electroquímica preparando nuevamente el biosensor después de cada medida y trabajando a una concentración de lactato de 10^{-4} M (DER 3,68 %) (Tabla 6.1). Así, el uso de diferentes biosensores origina una precisión similar a la obtenida con uno sólo preparado cada vez.

Tabla 6.1 Parámetros analíticos del biosensor EQL para lactato.

Parámetros	Valores	
Rango lineal, M	$10^{-5} - 5 \cdot 10^{-4}$	
Ordenada	$4,12 \pm 0,04$	
Pendiente	$0,91 \pm 0,04$	
r^2	0,992	
Límite de detección, M	$5 \cdot 10^{-6}$	
DER (%) blanco (n=10)	5,13	
DER (%) lactato (n=5)	$5 \cdot 10^{-5}$ M	3,91
	$2 \cdot 10^{-4}$ M	3,30
	$5 \cdot 10^{-4}$ M	4,20

El tiempo de vida del biosensor desechable fue estudiado manteniendo un conjunto de estos sensores protegidos de la luz y conservados a 4 °C. Se realizó chequeando regularmente una serie de biosensores a una concentración 10^{-4} M de lactato. Como puede verse en el diagrama de Shewhart de la Figura 6.23, la señal EQL va creciendo hasta alcanzar el quinto día, manteniéndose estable. El tiempo de vida obtenido corresponde aproximadamente a 2 meses, tiempo que es aceptable para este tipo de biosensores, comparable con el estudio del biosensor amperométrico de larga estabilidad basado en LOx por Mizutani y col. [26]. El coste del biosensor considerando reactivos, celdas electroquímicas serigrafadas y formadores de membrana puede ser de unos 1,06 €/unidad.

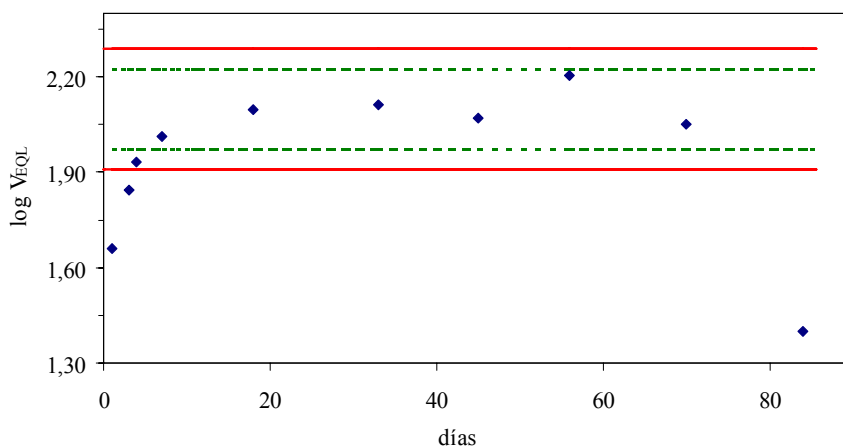


Figura 6.23 Diagrama de Shewhart del tiempo de vida del biosensor desechable de lactato.

Un estudio comparativo de los diferentes sensores existentes en bibliografía se muestra en la Tabla 6.2, mostrando que el biosensor desechable tiene una buena precisión pero un rango lineal mas corto comparado con los demás sensores.

Tabla 6.2 Comparación de las características de diferentes biosensores para lactato.

Sensor	Rango (M)	LD (M)	Precisión (%)	Aplicación	Ref.
Amperométrico Serigrafiado	$10^{-6} - 5 \cdot 10^{-4}$	$5 \cdot 10^{-7}$	2,5	lácteos, sangre y suero	[62]
Amperométrico Serigrafiado	$10^{-4} - 10^{-3}$	$5 \cdot 10^{-5}$	10,8	Vino	[63]
Amperométrico serigrafiado	$10^{-7} - 1,8 \cdot 10^{-6}$	10^{-7}	3,0	Lácteos	[64]
Sensor micromecanizado amperométrico	$10^{-5} - 5 \cdot 10^{-3}$	---	5 - 12	Sangre y saliva	[24]
QL Biosensor desechable	$5 \cdot 10^{-5} - 4 \cdot 10^{-3}$	$9,2 \cdot 10^{-6}$	5,5	Yogurt	[14]
EQL Chip biosensor	$2 \cdot 10^{-6} - 2 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-6}$	< 8,0	Suero	[20]
EQL Serigrafiado	$3 \cdot 10^{-7} - 10^{-4}$	$3 \cdot 10^{-7}$	4,4	---	[50]
EQL Biosensor desechable	$10^{-5} - 5 \cdot 10^{-4}$	$5 \cdot 10^{-6}$	3,9 - 4,2	Saliva	Esta Memoria

6.3.7. Aplicaciones

La viabilidad del biosensor descrito se chequeó analizando lactato en saliva humana. La saliva es una mezcla compleja de secreciones de las glándulas parótidas, submandibulares y sublinguales, conteniendo una mezcla de bacterias, células epiteliales y compuestos tanto inorgánicos como orgánicos entre los que se encuentra el ácido láctico [1]. En primer lugar se ensayaron la potencial interferencia que la saliva podría ocasionar en el análisis del lactato. Para ello se midió una disolución 10^{-4} M en lactato en presencia de saliva. Lo que se observó fue un decrecimiento de la señal EQL, disminución que depende de la dilución que se haya efectuado de la saliva (55,4 % a una dilución 1:2; 27,3 a dilución 1:4; 25,7 % a dilución 1:8; y 18,8 % a dilución 1:12).

Estos resultados sugieren un efecto matriz que podría ser reducido por dilución. Sin embargo, rectas de calibrado en presencia (por adición de patrón) y en ausencia de saliva muestran pendientes opuestas, confirmando el efecto (Figura 6.24).

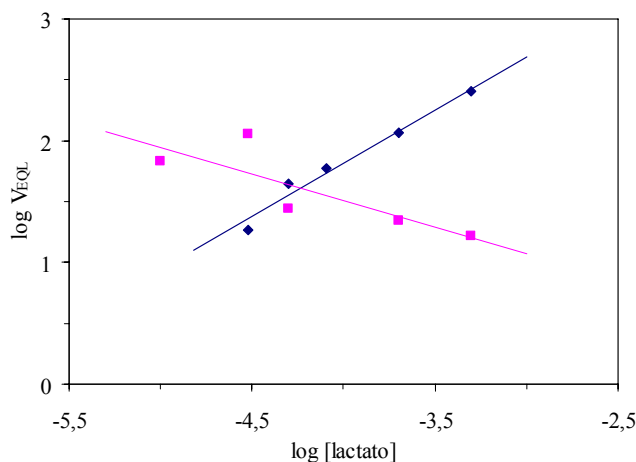


Figura 6.24 Representación del calibrado (◆) y la adición de patrón (■).

Para hacer frente a este efecto matriz, se estudiaron diferentes alternativas. Antes de nada hay que decir que se utilizaron salivas provenientes de sujetos sanos en ayunas y después de que se hubieran lavado los dientes y enjuagado la boca 30 minutos antes de la toma de la muestra [24].

En una primera instancia, empleamos algunos procedimientos para eliminar las proteínas, las células epiteliales y biomoléculas y así extraer el lactato. Para realizar esto se realizaron medidas EQL de saliva diluida 1:4 con el tampón de trabajo y con lactato 10^{-4} M añadido y se compararon los resultados con patrones de lactato de 10^{-4} M. La centrifugación es un método habitual porque paraliza la acción bacteriana y remueve tanto las células como la turbidez [1] pero nos originó una disminución de la señal EQL de un 14,3 %. Se emplearon otros métodos pero igualmente se obtuvo un descenso de la señal, así calentar con un baño de agua (descenso de un 51,3%); extraer con etil éter y hexano (10,2 % para el etil éter y 55,8 % para hexano); extraer en fase sólida mediante un cartucho C_{18} (32,4 %) y filtrar a través de filtros de jeringa (poro $0,25 \mu\text{m}$: 25,7 % y poro $0,40 \mu\text{m}$: 12,6%). Como podemos apreciar, cualquiera de los procedimientos ensayados supone una parcial eliminación de las interferencias [54,55].

Para estudiar los posibles interferentes, preparamos una saliva artificial [21] observando que la interferencia producida por la saliva artificial era similar a la ensayada por la saliva humana. Por lo tanto, se estudió la interferencia que producían los diferentes compuestos individuales de la saliva artificial (véase la Tabla 6.3), resultando que el ácido úrico y el ácido ascórbico fueron los principales interferentes.

Tabla 6.3 Contribución de los diferentes componentes de la saliva artificial en la señal EQL.

Componentes*	% Decrecimiento de señal EQL
CaCl ₂	0,0
KCl	0,0
NH ₄ Cl	0,3
Lactato	0,0
Ácido Cítrico	2,5
Ácido Ascórbico	98,3
Ácido Úrico	98,9
KSCN	6,8
CMC**	0,0

*Probados a las concentraciones de la saliva artificial;
**CMC: carboximetil celulosa.

Ambos ácidos son los interferentes más comunes en los biosensores amperométricos para lactato [56]. La concentración habitual de estos ácidos en la saliva es de $5 \cdot 10^{-3}$ M para el ácido úrico y 10^{-3} M para el ácido ascórbico, y su potencial de oxidación en el electrodo de grafito serigrafado de la celda electroquímica en nuestras condiciones de trabajo son 0,62 V y 0,11 V, respectivamente (Figura 6.25); valores similares han sido también obtenidos por John [57].

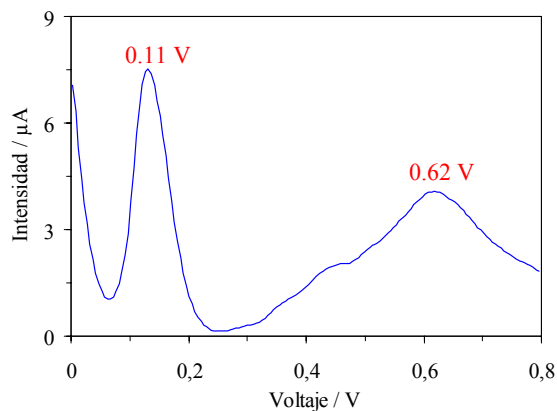


Figura 6.25 Voltamograma de una disolución de ácido ascórbico (10^{-3} M) y ácido úrico ($5 \cdot 10^{-3}$ M) en tampón fosfato 0,2 M a pH 9,0 y 0,25 M de NaCl.

El papel que tiene el ácido ascórbico cuando esta presente es la de reducir el H_2O_2 generado a partir de lactato. Como una posible vía de eliminación de esta interferencia se probó su oxidación previa en el electrodo de grafito serigrafado, procedimiento descrito para la determinación amperométrica de ácido úrico en presencia de ácido ascórbico [58,59]. Nosotros observamos que al aplicar un potencial de 0,4 V durante 4 s antes de la medida EQL provoca la oxidación del ácido ascórbico desapareciéndose por tanto esta interferencia a las concentraciones habituales presentes en la saliva. Además, si comparamos la calibración doble logarítmica para lactato en presencia y en ausencia de una cantidad constante de saliva, aplicando un potencial de 0,4 V para la muestra de saliva, observamos funciones lineales paralelas (pendientes con una similitud del 96,9 %) pero con desplazamiento en el eje Y; esto es, que existe todavía otra interferencia, debida al ácido úrico, pero que no hay efecto matriz (Figura 6.26). El ácido úrico es electroquímicamente oxidado [60], al mismo tiempo que el luminol, y este efecto interfiere en la medición.

Para estimar el efecto del ácido úrico, se añadieron diferentes concentraciones del mismo a las muestras de saliva, observándose un decrecimiento de la señal EQL cuando la concentración del ácido úrico aumenta. Del examen de las distintas funciones de calibrado para lactato con diferentes concentraciones de ácido úrico añadidas ($\log v_{EQL} = 0,94 \cdot \log[\text{lactato}] + 5,89$ sin adición de ácido úrico ; $\log v_{EQL} = 0,89 \cdot \log[\text{lactato}] + 4,64$ para $2 \cdot 10^{-4}$ M de ácido úrico; $\log v_{EQL} = 0,92 \cdot \log[\text{lactato}] + 3,62$ para $5 \cdot 10^{-3}$ M de ácido úrico) (Figura 6.26) concluimos que el ácido úrico solamente afecta a la ordenada y no contribuye al efecto matriz.

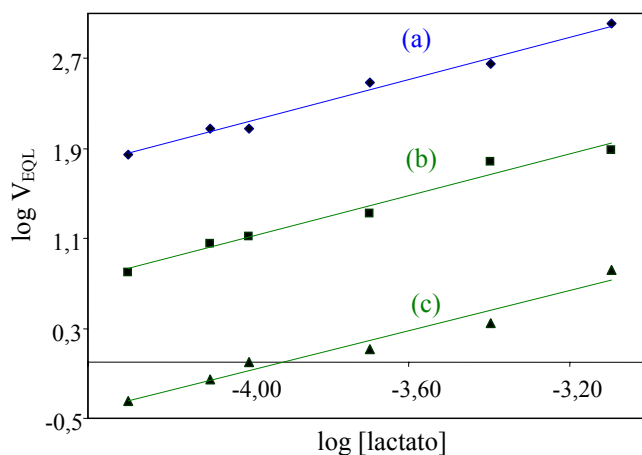


Figura 6.26 Efecto de la concentración del ácido úrico en la curva de calibración de lactato con: (a) no adición; (b) $2 \cdot 10^{-4}$ M y (c) $5 \cdot 10^{-3}$ M.

Para corregir este error que supone la presencia de ácido úrico, utilizamos el procedimiento del blanco interno [61]. Este blanco (v_{blanco}) es obtenido preparando una serie de sensores que no contienen la enzima LOx, obteniendo de este modo la señal EQL blanco personalizada para cada muestra de saliva.

Resumiendo, es posible analizar lactato en la saliva con el biosensor EQL propuesto utilizando una dilución 1:4 con el tampón de trabajo, filtración a través de un filtro de celulosa de $0,40 \mu\text{m}$, seguido de un pretratamiento del mismo biosensor aplicando un potencial de $0,4 \text{ V}$ durante 4 s y finalmente una corrección de blanco individual para cada muestra de saliva.

Para verificar la veracidad del procedimiento propuesto, se analizaron salivas provenientes de tres personas diferentes, validando los resultados a través de un método enzimático espectrofotométrico (kit Boehringer-Mannheim) utilizado como método de referencia (Tabla 6.4).

Tabla 6.4 Determinación de lactato en saliva por el método propuesto y el de referencia.

Muestra de Saliva	Biosensor EQL (M)	Método de Referencia (M)	P.C.M ^a (%)	P _{val} (%)
1 *	$(3,10 \pm 0,25) \cdot 10^{-4}$	$(3,11 \pm 0,13) \cdot 10^{-4}$	99,6	94,6
2 **	$(6,9 \pm 1,5) \cdot 10^{-4}$	$(8,39 \pm 0,79) \cdot 10^{-4}$	82,2	35,9
3 *	$(3,37 \pm 0,01) \cdot 10^{-4}$	$(3,39 \pm 0,35) \cdot 10^{-4}$	99,4	94,3

^a P.C.M.: porcentaje de comparación de métodos.

* Hombre; ** Mujer

6.4. Conclusiones

Se ha desarrollado un biosensor electroquimioluminiscente desechable para lactato en saliva utilizando un sistema basado en el reconocimiento enzimático por lactato oxidasa y la transducción a partir de luminol. Hemos tenido éxito en preparar y optimizar un sensor óptico desechable simple, a través de la inmovilización de todos los reactivos en una membrana de Methocel en celdas electroquímicas comerciales serigrafiadas de grafito. Este biosensor respeta al medio ambiente y tiene un tiempo de vida estimado de dos meses si se protege de la luz en condiciones normales. Buena repetibilidad, rápida adquisición (20 s) y versatilidad hacen posible su aplicación para monitorizar lactato en muestras de saliva en análisis de rutina. El tratamiento de la muestra de saliva es compatible dentro de los formatos de biosensores desechables. Para nuestro conocimiento este es el primer biosensor EQL que se emplea para monitorizar lactato en sali-

va, de este modo podría ser considerado como una alternativa de análisis no invasivo a la habitual determinación de lactato en sangre.

6.5. Bibliografía

1. G.G. Guilbault, G. Palleschi, G. Lubrano, *Biosensors Bioelectron.* 10 (1995) 379.
2. R.V.T. Santos, A.L.R. Almeida, E.C. Caperuto, J. Martins, L.F.B.P. Costa Rosa, *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 145 (2006) 114.
3. D.C. Klonoff, *Diabetes Tech. Therapeut.* 5 (2003) 929.
4. B. Detry, W. Nullens, M.L. Cao, A. Frans, A. Robert, T. Clerbaux, *European Respiratory Journal* 11 (1998) 183.
5. Suman, A. Kumar, *Sensors & Transducers Journal* 96 (2008) 18.
6. K. Yoda, K. Shimazaki, Y. Ueda, *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 864 (1998) 600.
7. M. Gerard, A. Chaubey, B.D. Malhotra, *Biosensors Bioelectron.* 17 (2002) 345.
8. X. Cui, C.M. Li, J. Zang, S. Yu, *Biosensors & Bioelectronics* 22 (2007) 3288.
9. MedizinMedizin. Overview: Lactate Analysers. 2008. <http://medizin.li/lactate/>.

-
10. C.A. Marquette, A. Degiuli, L.J. Blum, *Appl.Biochem.Biotechnol.* 89 (2000) 107.
 11. S. Girotti, S. Ghini, G. Carrea, R. Bovara, A. Roda, R. Budini, *Anal.Chim.Acta* 255 (1991) 259.
 12. H. Nakamura, Y. Murakami, K. Yokoyama, E. Tamiya, I. Karube, M. Suda, S. Uchiyama, *Anal.Chem.* 73 (2001) 373.
 13. A. Hemmi, K. Yagiuda, N. Funazaki, S. Ito, Y. Asano, T. Imato, K. Hayashi, I. Karube, *Anal.Chim.Acta* 316 (1995) 323.
 14. J. Ballesta-Claver, M.C. Valencia-Mirón, L.F. Capitán-Vallvey, *Anal.Chim.Acta* 629 (2008) 136.
 15. J. Samsonova, V. M.Y. Rubtsova, M. Franek, *Anal.Bioanal.Chem.* 375 (2003) 1017.
 16. Hasegawa, A., Chemiluminescent analytical test strip and holder, JP 08184595 (1994).
 17. Capitán-Vallvey, L. F. *Encyclopedia of Sensors*, Grimes, C. A.; Dickey, E. C.Pishko, M. V., Eds.; 1 ed.; The Pennsylvania State University: Pennsylvania, USA, 2005.
 18. M.M. Richter, *Chem Rev.* 104 (2004) 3003.
 19. C.A. Marquette, L.J. Blum, *Sens.Actuators B* B90 (2003) 112.

-
20. C.A. Marquette, A. Degiuli, L.J. Blum, *Biosensors Bioelectron.* 19 (2003) 433.
 21. J.Y. Gal, Y. Fovet, M. dib-Yadzi, *Talanta* 53 (2001) 1103.
 22. D.-J. Oh, J.-Y. Lee, Y.-K. Kim, H.-S. Kho, *Int J Oral Maxillofac Surg* 37 (2008) 1027.
 23. Boehringer Mannheim. Boehringer Mannheim L-lactate kit. 2006.
 24. C.G.J. Schabmueller, D. Loppow, G. Piechotta, B. Schuetze, J. Albers, R. Hintsche, *Biosensors Bioelectron.* 21 (2006) 1770.
 25. I. Palchetti, S. Majid, A. Kicela, G. Marrazza, M. Mascini, *Intern.J. Environ. Anal. Chem.* 83 (2003) 701.
 26. F. Mizutani, S. Yabuki, Y. Hirata, *Anal. Chim. Acta* 314 (1995) 233.
 27. C. Chouteau, S. Dzyadevych, C. Durrieu, J.M. Chovelon, *Biosensors Bioelectron.* 21 (2005) 273.
 28. E.V. Gogol, G.A. Evtugyn, J.-L. Marty, H.C. Budnikov, V.G. Winter, *Talanta* 53 (2000) 379.
 29. N.M. Rao, K. Hool, T.A. Nieman, *Anal. Chim. Acta* 266 (1992) 279.
 30. I. Palchetti, S. Laschi, M. Mascini, *Anal. Chim. Acta* 530 (2005) 61.
 31. J. Gu, P. Xu, Y. Qu, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 18 (2002) 299.
 32. G.P. Jirka, A.F. Martin, T.A. Nieman, *Anal. Chim. Acta* 284 (1993) 345.

-
33. M.M.J. Oosthuizen, M.E. Engelbrecht, H. Lambrechts, D. Greyling, R.D. Levy, *J.Biolumin.Chemilumin.* 12 (1997) 277.
 34. B. Lillis, C. Grogan, H. Berney, W.A. Lane, *Sensors and Actuators B: Chemical* 68 (2000) 109.
 35. O.M. Schuvailo, O.O. Soldatkin, A. Lefebvre, R. Cespuglio, A.P. Soldatkin, *Anal.Chim.Acta* 573-574 (2006) 110.
 36. H. Karatani, *Bull.Chem.Soc.Jpn.* 60 (1987) 2023.
 37. G.B. Schuster, *Acc.Chem.Res.* 12 (1979) 366.
 38. B. Lillis, C. Grogan, H. Berney, W.A. Lane, *Sens.Actuators B* 68 (2000) 109.
 39. B.B. Kim, V.V. Pisarev, A.M. Egorov, *Anal.Biochem.* 199 (1991) 1.
 40. Y. Huang, W. Liu, *J.Pharm.Biomed.Anal.* 38 (2005) 537.
 41. H.P. Misra, P.M. Squatrito, *Arch.Biochem.Biophys.* 215 (1982) 59.
 42. L. Zhu, Y. Li, F. Tian, B. Xu, G. Zhu, *Sens.Actuators B* 84 (2002) 265.
 43. S. Sakura, *Anal.Chim.Acta* 262 (1992) 49.
 44. H.X. Yu, H. Cui, *J.Electroanal.Chem.* 580 (2005) 1.
 45. Y. Su, J. Wang, G. Chen, *Anal.Chim.Acta* 551 (2005) 79.
 46. K.E. Haapakka, J.J. Kankare, *Anal.Chim.Acta* 138 (1982) 263.

-
47. J. Lee, H.H. Seliger, *Photochem.Photobiol.* 15 (1972) 227.
 48. W. Wang, H. Cui, Z.X. Deng, Y.P. Dong, J.Z. Guo, *J.Electroanal.Chem.* 612 (2008) 277.
 49. Z. Lin, J. Sun, J. Chen, L. Guo, G. Chen, *Electrochim.Acta* 53 (2007) 1708.
 50. B.P. Corgier, C.A. Marquette, L.J. Blum, *Anal.Chim.Acta* 538 (2005) 1.
 51. K.A. Fahrnich, M. Pravda, G.G. Guilbault, *Talanta* 54 (2001) 531.
 52. G. Salgado, J. Navarrete, C. Bustos, C. Sanchez, R. Ugarte, *Química Nova* 29 (2006) 381.
 53. Miller, N. J.; Miller, J. C. *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*, 4 ed.; Prentice Hall: Madrid, 2002.
 54. Karaburun, F. MIDDLE EAST TECHNICAL UNIVERSITY, 2004.
 55. G. Kyuchoukov, D. Yankov, J. Albet, J. Molinier, *Industrial & Engineering Chemistry Research* 44 (2005) 5733.
 56. G. Palleschi, M.H. Faridnia, G.J. Lubrano, G.G. Guilbault, *Anal.Chim.Acta* 245 (1991) 151.
 57. S.A. John, *J.Electroanal.Chem.* 579 (2005) 249.
 58. J. Wu, J. Suls, W. Sansen, *Electrochemistry Communications* 2 (2000) 90.

-
59. J.M. Zen, C.T. Hsu, *Talanta* 46 (1998) 1363.
 60. J. Marsh, G. Dryhurst, *J. Electroanal. Chem.* 95 (1979) 81.
 61. Ramis Ramos, G.; Garcia Alvarez-Coque, M. C. *Quimiometria, Sintesis S.A.*: Madrid, 2000.
 62. N.G. Patel, A. Erenkötter, K. Cammann, G.C. Chemnitz, *Sens. Actuators B* 67 (2000) 134.
 63. A. Avramescu, T. Noguier, V. Magearu, J.L. Marty, *Anal. Chim. Acta* 433 (2001) 81.
 64. F. Ghamouss, S. Ledru, N. Ruillq, F. Lantier, M. Boujtita, *Anal. Chim. Acta* 570 (2006) 158.

PROYECTOS FUTUROS

*“El estado actual de nuestro conocimiento es siempre provisional,
y deben de existir más allá de lo que actualmente conocemos
inmensas regiones nuevas que descubrir”*



*Louis de Broglie (1892-1987)
Premio Nobel de Física en 1929*

PROYECTOS FUTUROS

Tras la realización de las metodologías desarrolladas en esta Memoria conviene mencionar la practicabilidad y la orientación que estas técnicas pueden tomar para su desarrollo posterior.

1. Con respecto al sistema de flujo que incorpora una columna monolítica como elemento separativo, es posible la incorporación de más de una química de detección quimioluminiscente, además de la ya empleada Ce(IV) y Rodamina 6G, para determinar más analitos y así aumentar la capacidad separativa de la propia columna al incrementar la selectividad de la detección.
2. Con respecto al sensor electroquimioluminiscente de lactato en saliva, actualmente se está desarrollando junto con el Profesor Titular Alberto Palma López y el Profesor Ayudante D. Antonio Martínez Olmos, am-

bos del Departamento de Electrónica y Tecnología de Computadores de la Universidad de Granada, una instrumentación portátil para la medida de electroquimioluminiscencia generada por sensores serigrafados para lactato. Sensores que son similares a los descritos en el Capítulo 6 de esta Memoria. El prototipo de instrumentación portátil permite mediante un potenciómetro generar la señal eléctrica necesaria para desencadenar la oxidación electroquímica del luminol presente en el electrodo de trabajo del sensor de un solo uso y mediante un fotodiodo realizar la recogida de los fotones generados (Figura 1).

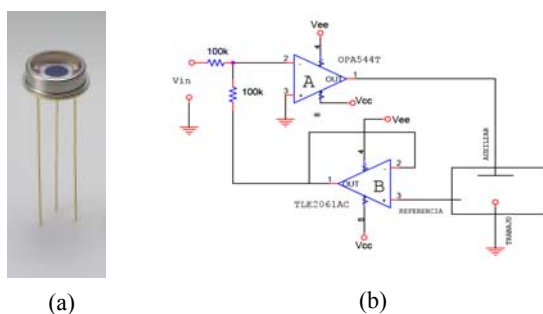


Figura 1. Prototipo de instrumentación portátil para la medida de lactato mediante biosensores serigrafados de un solo uso. (a) Fotodiodo, (b) potenciómetro.

Este proyecto está en fase de desarrollo por lo que no se ha incluido en la presente Memoria. Hasta la fecha se ha construido un primer prototipo (Figura 2) y se han realizado medidas con resultados satisfactorios. En la Figura 3 se muestra una función de calibrado obtenida. Se preten-

de con ello desarrollar una instrumentación portátil para la determinación de lactato en saliva.



Figura 2. Prototipo desarrollado.

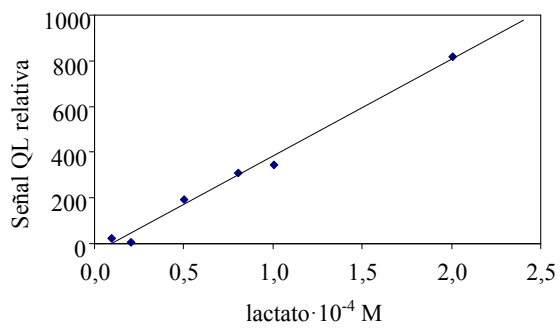


Figura 3. Calibrado obtenido a partir del prototipo desarrollado.

Creemos que este prototipo puede ser una buena plataforma para el desarrollo futuro de nuevos sensores electroquimioluminiscentes de interés en el campo agroalimentario y clínico.

3. Otro de los campos en que se pretende abordar son las determinaciones multianalito usando para ello celdas serigrafiadas de más de un electrodo de trabajo pudiendo así hacer determinaciones simultáneas de análisis utilizando dispositivos de captura de imagen.

CONCLUSIONES

*“Dios no solo juega a los dados:
a veces los tira donde no se pueden ver”*



*Stephen William Hawking (nacido en 1942)
Medalla Copley en 2006*

CONCLUSIONES

Todo trabajo realizado debe ser valorado para obtener finalmente unas conclusiones. Éstas son las siguientes:

1. Se han diseñado y optimizado diferentes métodos de flujo para determinar la concentración de diversos aditivos. Estos métodos se basan en la medida de emisión quimioluminiscente en la célula de flujo y ofrecen buenas características analíticas, pudiéndose considerar como una alternativa económica para obtener información analítica.
2. Se ha propuesto un método para separación de una mezcla de cuatro parabenos MP, EP, PP y BP utilizando una columna monolítica muy corta (5 mm) y detección quimioluminiscente. El empleo de esta detección quimioluminiscente mediante la reacción Ce(IV)-Rodamina 6G mejora la amplitud del rango lineal y disminuye el límite de detección en unos

dos órdenes de magnitud respecto a la detección espectrofotométrica, manteniendo la precisión. La detección quimioluminiscente incrementa la sensibilidad del método pudiendo ser aplicado en el análisis de cosméticos con precisiones del orden de 2-6 % y con un tiempo de análisis muy pequeño (150 s).

Tabla 1. Comparación entre HPLC y cromatografía a baja presión.

Sistema	Ventajas	Inconvenientes
FIA QL	Instrumentación económica, sencilla y rápida. Empleo de columnas más pequeñas. Fácil mantenimiento. Menor tiempo de análisis. Óptimo para separaciones con pocos analitos.	Lavado más frecuente de la mini-columna. Mayor número de conexiones FIA, y por tanto posibles fugas de líquidos. Deterioro tubos PVC de la bomba peristáltica. Inyección manual
HPLC QL	Más capacidad resolutive. Mayor rango lineal. Mayor precisión. Óptimo para separaciones con múltiples analitos.	Alto tiempo de análisis. Mayor tiempo de lavado y acondicionamiento de la columna. Instrumentación más costosa.

-
3. Se ha efectuado con éxito la determinación de una mezcla de cinco compuestos fenólicos, como son floroglucinol, ácido 2,4-dihidroxibenzóico, ácido salicílico, metil paraben y n-propil galato utilizando un sistema cromatográfico a baja presión basado en una columna monolítica muy corta (5 mm) y detección quimioluminiscente, que se ha usado para su determinación en productos dermocosméticos. Para mejorar la sensibilidad del sistema en la determinación de los analitos se han utilizado dos condiciones químicas diferentes de la reacción química Ce(IV)-Rodamina 6G, con la consecuente mejora en la sensibilidad de la detección quimioluminiscente, detectándose niveles de hasta $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$.
 4. Se han desarrollado y caracterizado sensores quimioluminiscentes de un solo uso preparando membranas que facilitan análisis rápidos, determinaciones *in situ* y portabilidad.
 5. Se ha propuesto un sensor de un solo uso quimioluminiscente para la determinación de hipoclorito en aguas mediante la inmovilización del anión fluoresceinato en una membrana de papel de cambio aniónico. El sensor ofrece una buena repetibilidad, puede reutilizarse, es simple de preparar y usar, respeta al medio ambiente y puede ser considerado como una alternativa económica para obtener información analítica.
 6. Se han preparado biosensores de un solo uso mediante la inmovilización de enzimas mejorando la selectividad de la determinación. Este es el caso de los biosensores de un solo uso para la determinación de lactato utilizando la enzima lactato oxidasa.

7. El empleo de la química del luminol junto con peroxidasas facilita la determinación de moléculas orgánicas que generan peróxido de hidrógeno, siendo la enzima procedente de *Artromyces Ramosus* la que ofrece mejores resultados en este biosensor.
8. El empleo de membranas poliónicas o derivados de la celulosa como Methocel, permiten la inmovilización de luminol y la consecuente utilización de la quimioluminiscencia en química seca.
9. El uso de metales como catalizadores y estabilizadores de las reacciones quimioluminiscentes mejora la sensibilidad de los sistemas y el rendimiento de las peroxidasas, como es el caso del empleo de aluminio en el biosensor de un solo uso para lactato en yogur.
10. La construcción de una membrana permselectiva de tipo poliónico, como la utilizada en esta Memoria, facilita la rápida y selectiva entrada de analito mediante cambio iónico, facilitándose y haciéndose más selectiva la reacción quimioluminiscente; ofreciendo además un buen medio para la inmovilización de enzimas.
11. El biosensor quimioluminiscente de un solo uso para lactato en yogur presenta las ventajas de reducir la contaminación por uso de reactivos en disolución, una reducción del coste y de gasto de los mismos.
12. La precisión de los sensores o biosensores de un solo uso desarrollados presentan valores en tono al 5 y 12 % dependiendo del tiempo de adquisición utilizado, valores que podrían mejorarse empleando sistemas de producción en masa.

13. El tiempo de vida de los (bio)sensores desarrollados depende exclusivamente de la estabilidad enzimática de sus componentes.
14. La utilización de celdas electroquímicas serigrafadas de grafito favorece a la portabilidad de estos sistemas, siendo posible el empleo de elementos comerciales con buenos resultados, lo que facilita su difusión y utilización.
15. La determinación electroquimioluminiscente frente a la quimioluminiscente presenta las siguientes ventajas:

Tabla 2. Comparación de (bio)sensores quimioluminiscentes frente a los electroquimioluminiscentes.

Sensores	Ventajas	Inconvenientes
Sensores QL	<ul style="list-style-type: none"> - Mínimo uso de reactivos. - Mayor tiempo de conservación. 	<ul style="list-style-type: none"> -Baja repetibilidad -Baja selectividad
Biosensores QL	<ul style="list-style-type: none"> - Fabricación simple. - Instrumentación sencilla. - Selectividad. 	<ul style="list-style-type: none"> -Necesidad de un sistema de inyección automático - Manipulación enzimática
Biosensores EQL	<ul style="list-style-type: none"> - Bajos límites de detección. - Mayor precisión. - Selectividad. - Mayor sensibilidad. - Control del inicio de la reacción. 	<ul style="list-style-type: none"> -Selección de electrodos -Efectos interferentes de las muestras.

16. El desarrollo del biosensor electroquimioluminiscente de un solo uso para lactato en saliva presenta una buena repetibilidad, rápida adquisición (20 s) y versatilidad, lo que hace posible su aplicación para monitorizar lactato en muestras de saliva en análisis de rutina.

17. La monitorización de lactato en saliva puede llevarse a cabo de modo no invasivo siendo una alternativa a la habitual determinación en sangre.

ANEXO I: PUBLICACIONES



Determination of hypochlorite in water using a chemiluminescent test strip

J. Ballesta Claver, M.C. Valencia Mirón, L.F. Capitán-Vallvey*

Research Group of Solid Phase Spectrometry, Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Granada, Avda. Fuentenueva s/n, E-18071 Granada, Spain

Received 14 March 2004; received in revised form 23 June 2004; accepted 23 June 2004

Available online 1 August 2004

Abstract

We have developed a selective and reusable chemiluminescent test strip to determine hypochlorite. The hypochlorite-sensitive test strip contains a 10 mm × 9 mm piece of anionic cellulose paper in fluoresceinate cycle, glued to a 10 mm × 4 cm × 0.5 mm polyester strip. The measurement of the chemiluminescence in a luminometer when 1 ml of sample is injected into a conventional cell containing the strip makes it possible to determine hypochlorite. The composition of the membrane and reaction conditions have been adjusted to obtain adequate sensitivity and selectivity. The test strip responded linearly to hypochlorite over two linear ranges, the first 2.0–10.3 mg L⁻¹ and the second 10.3–51.4 mg L⁻¹, with a detection limit of 0.4 mg L⁻¹. The reproducibility using the same disposable test strip at a medium level of the range was 6.6%, as relative standard deviation (R.S.D.), and 12.3% using different test strips. The procedure was applied to the determination of hypochlorite in different types of waters.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Hypochlorite determination; Chemiluminescence; Strip test; Water analysis

1. Introduction

Rapid and accurate determination of the presence or concentration of target analytes is of interest to different fields, including medical diagnostic, environmental control, industrial, and others. Of the different types of rapid methods on the market, the dry-chemical methods, also known as test strips, are probably those that make up the most active market with the largest sales volume. Their advantages include lower costs, ease in handling, short analysis time and the ability to make quick decisions when unforeseen problems arise without the use of a conventional laboratory. In dry assays, chemical or specific binding reactions can be carried out in the test strip with the analyte being detected within the element upon reaction of various reagents when a problem is applied to the test device. The use of proper dry chemistries combined with a colour scale, bench-

top instruments or miniature devices makes it possible to obtain the assay value [1]. Among optical test strips, the most commonly used are those based on the measurement of diffuse reflectance, absorption of radiation or fluorescence and to a much lesser extent, on the use of chemiluminescence.

Patented chemiluminescent test strips are mainly enzymatic or immunological and the CL measurement is carried out by a luminometer or different types of photographic films [2] with a densitometer or a scanner [3]. The enzymatic strips are multi-layered analytical elements. Furuya et al. [4] used a chemiluminescent reagent layer and a spreading layer that spreads the sample to the reagent layer which contains a luminol and glucose oxidase/peroxidase system in hydrophilic polymers for glucose analysis. Vogelhut [5] used the same chemistry, but his reagent layer contains the chemiluminescent system encapsulated in osmosensitive microcapsules to improve the lifetime and he added a photoresponsive layer made up of a photographic film with a protective layer covering.

* Corresponding author. Tel.: +34 958243292; fax: +34 958243294.
E-mail address: lcapitan@ugr.es (L.F. Capitán-Vallvey).

Chemiluminescent immunotest strips, both heterogeneous and homogeneous formats, have been described. Various specific binding heterogeneous assay formats have been used including nucleic acid hybridisation assays, immunochemical assays such as enzyme immunoassays, sandwich assays, competitive binding assays, and direct binding assays.

The common areas in those test strips are reagent layers and trapping layers. The reagent layer contains the signal-generating labelled ligand which immunochemically binds to the analyte species. The label could be enzymes such as peroxidase [6] or an enzyme other than peroxidase such as glucose oxidase or alkaline phosphatase [7]. Alternatively, bioluminescent proteins, such as aequorin, have been used as a label [8]. The trapping layer contains a binding agent, i.e. avidin, antigen, antibody, receptor, et al. immobilized by absorption or covalent binding to a carrier such as glass or polymer beads, fibres or membranes, in the spreading zone or an alternative intermediate layer which is capable of either competing with the analyte for binding sites on the immobilized binding agent or binding with a reagent-analyte complex. The separation of unbound label compounds as well as interfering sample components from the reaction zone prior to the CL measurement can be accomplished by applying a stream of a washing solution to the reaction zone in a sufficient volume to separate unbound materials from the reaction zone.

Current thin film immunoassays typically have a washing volume capacity of from about 10 to 20 μL , although it is possible to increase the washing volume to about 1 mL, depending on the thickness of the element [6]. The use of an absorbent layer around the area being read removes the washing fluid from this area. The addition of a solution detection chemistry (luminol, hydrogen peroxide/perborate, surfactants, sensitizer [9]) to the strip triggers the CL reaction.

In the case of homogeneous formats, a three-zone test strip is used. The second zone traps the labelled ligand coming from the first zone that has not reacted with the analyte. The third zone contains the chemicals necessary to trigger the CL response, for example, calcium when the photoprotein aequorin is used as a label for antibodies used as a ligand. If enzyme-linked antibodies are used, the third zone contains luminol among other necessary reagents [8].

A dipstick format has been described to discriminate between three pesticides from the group of *s*-triazines, using a competitive immunoassay with a hapten labeled with horseradish peroxidase. The use of a neural network makes it possible to discriminate between the analytes [10]. Similarly, a competitive immunoassay with chemiluminescent detection has been proposed for the screening of 2,4-D in water samples [11].

The determination of free chlorine (HClO , ClO^- , Cl_2) is important to suppliers, as well as to both domestic and industrial consumers because of its widespread use as a water disinfectant. There are different visual or colorimetric test strip procedures based mostly on the use of redox dyes, such

as benzidine-type [12,13] or on reaction with iodide and cellulose type polymer [14].

In this paper, we develop a monolayer test strip procedure to determine hypochlorite based on the measurement of chemiluminescence produced in its reaction with fluoresceinate anion. The test strip proposed here offers enough selectivity for its application to waters.

2. Experimental

2.1. Chemicals

All chemicals used were of analytical-reagent grade. Reverse-osmosis type quality water (Milli-Q plus185 from Millipore S.A.S 67120, Molsheim, France) was used throughout. A standard solution of hypochlorite was prepared fresh daily by diluting ca. 10% sodium hypochlorite solution (Panreac, Barcelona, Spain), which was adjusted to pH 9.5 with 10^{-2} M HCl and standardized by iodimetry. Fluorescein (CAS No. 171832) also from Panreac. For membrane making we used D4 polyurethane hidrogel from Tyndall-Plains-Hunter Ltd. (Ringo, NY, USA), poly(vinylchloride) of high molecular weight (PVC), polyvinylpyridine (PVP), and cellulose triacetate, all supplied by Sigma (Sigma-Aldrich Química, SA, Madrid, Spain). Other chemicals were tributylphosphate (TBP), tetraethylammonium tetraphenylborate (TFB) (Fluka, Buchs, Switzerland), Aliquat 336, tetrahydrofuran (THF). Silicagel 60 on aluminium sheet (Merck, Darmstadt, Germany), anion-exchange gel Sephadex QAE-25 (Sigma), weak anion exchanger paper Whatman DE-81 (Whatman, Maidstone, UK), sheets of Mylar type polyester (Goodfellow, Cambridge, UK) were used as support.

2.2. Apparatus and software

CL emission was measured using a CL-1 Camspec luminometer equipped with an external chamber for CL measurement from standard UV-vis cells. This accessory consists of a metallic rectangular box with a built-on cell holder. The 12 mm wide cell holder is made of a matte black painted iron block that closes with a metallic lid to avoid external light. The PMT is next to the cell and a switch makes the measurement possible. The cell lid has a central hole for sample introduction by means of a 6 cm PVC tube painted black. The whole accessory is shut with a black metallic cover that has a hole similar to that of the cell lid. To check the accessory, a LED-based test system was used. The luminometer was interfaced to a Pentium III microcomputer via an INT7-24 bit A/D integration board for luminescence acquisition and subsequent manipulation of data.

Fluorescence spectra were performed with a Cary Eclipse fluorescence spectrophotometer with a peltier single cell holder (Varian, Palo Alto, USA) and the absorbance spectra of the test strips were measured with a Lambda 2 UV-vis

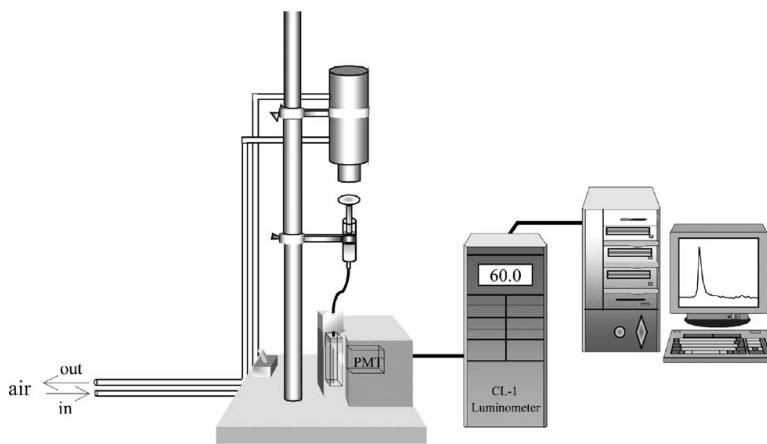


Fig. 1. Set-up used for CL measurement.

spectrophotometer (Perkin-Elmer, Ueberlingen, Germany) with a reflectance spectroscopy accessory.

The introduction of the sample was made by means of a conventional syringe of different volumes with a double-acting pneumatic system designed by us (Fig. 1) to improve the reproducibility of the measurements.

Other apparatus and laboratory materials consist of a laboratory-made spin-on device [15], a Crison (Crison Instruments, Barcelona, Spain) digital pH-meter with combined glass-saturated electrode and Hellma OS and QS 100 cells with 1, 2, 5 and 10 mm light path.

Software programs used for the treatment of the data were: CSW32 software package supplied by DataApex Ltd. v 1.2.5, Prague, Czech Republic, 2001, used for the acquisition and manipulation of the luminescence data; Statgraphics software package (Manugistics Inc. and Statistical Graphics Corporation, USA, 1992), ver.6.0 STSC Inc. Statistical Graphics Corporations, USA, 1993.

2.3. Membrane preparation

The hypochlorite-sensitive test strips were prepared by soaking for 5 min 10 mm × 90 mm strips of anionic cellulose paper DE81 in a 3×10^{-4} M sodium fluoresceinate (pH 10.5) (uranine) aqueous solution placed in a 50 ml petri dish. These were then washed for 30 s with water in another petri dish and later dried for 2 h at room temperature. Later, the yellow coloured papers were cut into 10 mm × 9 mm size strips and glued to a 10 mm × 4 cm × 0.5 mm polyester type Mylar sheet by means of a 7×10^{-4} M cellulose triacetate solution in dichloromethane.

2.4. CL measurements

The light emitted from the test strip was measured directly by the PMT with no wavelength discrimination. Unless stated

otherwise, peak height was measured as the luminescence signal.

2.5. Procedure for samples and standards

An aliquot of an aqueous standard solution or a problem containing between 2.0 and 52 mg L⁻¹ in hypochlorite was prepared and the pH adjusted to 9.5 with NaOH or HCl solutions depending on its pH, and 1 ml was taken with a 1 ml syringe. A hypochlorite-sensitive test strip was placed on one side of a 5 mm cell, namely in front of the PMT, and after closing the accessory with the two lids, the sample was injected into the cell through the PVC tube by means of the syringe driven by a pneumatic piston, measuring the CL emission. Calibration graphs were similarly obtained using hypochlorite solutions of known concentration.

3. Results and discussion

3.1. Selection of solid support

From different xanthene dyes we selected uranine because basic dyes such as Rhodamine 6G or Pyronin Y give higher CL signals but proceed slowly [16].

We tested different types of membranes to retain fluoresceinate anions (uranine) and react with hypochlorite that produce chemiluminescence. These were both membrane-forming polymers that acted as an immobilisation matrix such as D-4 polyurethane, PVP, PVC and cellulose acetate; and solid supports that retained fluoresceinate by adsorption or ion-exchange, such as silica gel supported on aluminium plate, cellulose conventional filter paper and DE-81 cellulose anion exchanger paper with amino as functional groups.

In the first case, the membranes were prepared from solutions of polymers and uranine in a solvent and casting on a

transparent support with a spin-on device or, alternatively, using a Sephadex-type anion-exchanger in fluoresceinate cycle dispersed in a solution of hydrophilic polymer. In the case of solid supports, membranes were prepared by adding a known volume of an aqueous uranine solution with a micropipette and drying at room temperature. In both cases, the amount of dye per area unit was similar.

The reaction of the prepared membranes with 10^{-3} M ClO^- solution carried out as indicated in the experimental section, show that a higher CL signal was obtained for DE-81 anionic exchanger paper (100%), than for D-4 polyurethane with uranine (74%), PVP (26%), and PVC (13%). The others membranes do not respond to hypochlorite and cellulose leach fluoresceinate in contact with water. We selected DE-81 anionic exchanger paper as a solid phase for the reagent due to its higher CL signal, shortest response time, reproducibility, ease in preparation and possibility of reuse.

3.2. CL reaction in solid phase

The uranine containing test strip shows a broad band with the absorption maximum in the diffuse reflectance spectrum at 510 nm (490 nm in solution) and after reacting with ClO^- , the maximum of the broad signal is red-shifted to 527 nm, a slight red colour appearing on the strip. The fluorescence emitted from the paper surface shows a $\lambda_{\text{exc}} = 517$ nm and $\lambda_{\text{em}} = 541$ nm ($\lambda_{\text{exc}} = 489$ nm and $\lambda_{\text{em}} = 519$ nm in solution) and after reaction with the analyte, $\lambda_{\text{exc}} = 518$ nm and $\lambda_{\text{em}} = 547$ nm. The chemiluminescence spectrum has an emission maximum between 537 and 547 nm. These data show that the reaction is sensitised by either uranine or a related substance. Simultaneous to the CL reaction, the yellow ion exchanger paper turns a not very intense red colour immediately after hypochlorite addition and remains without change, except if the hypochlorite concentration is very high, in which case the day is totally bleached.

Additionally, the reagent fluorescein can exist in three solid forms: colourless lactone structure, yellow zwitterion structure and red p-quinonoid structure. In aqueous solution, the yellow pH-dependent structure predominates, being the more fluorescent totally deprotonated form.

The CL reaction mechanism can be explained in a similar way to rhodamine 6G with hypochlorite [17] or other xanthene dyes [18, 19], through the production of singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) followed by the transfer of energy from singlet oxygen to uranine. The singlet oxygen generation may be produced by oxidation by means of hypochlorite of the carboxylate group of fluoresceinate anion which renders a peroxyacid which decomposes, producing singlet oxygen and regenerating the fluoresceinate anion. Additionally, the oxidative decarboxilation of fluorescein may produce a less soluble related compound that may be adsorbed in the cellulose fibers in its p-quinonoid red structure. As can be expected, the addition of hydrogen peroxide enhances the chemiluminescence intensity.

3.3. Optimisation of test strip

The responses of the chemiluminescent test strip were optimised taking into consideration: (1) factors related to the design and composition of the membrane (reagent concentration, contact time, time of drying, and test strip design); and (2) variables related to the hypochlorite reaction (pH, ionic strength, hypochlorite concentration).

The membrane was prepared by soaking strips of the selected anion exchange paper in a sodium fluoresceinate solution (pH 10.5) for 5 min. After retention, it was necessary to remove the excess reagent because since it is retained both by ion-exchange and adsorption, it presents different behaviours depending on the retention process. The signal is higher and faster for fluoresceinate retained by adsorption than for ion-exchange, but the reproducibility of the membrane preparation is lower and suffers leaching from the membrane. Thus, we washed the ion-exchange paper after reagent retention with water to eliminate the adsorption effect, to the extent possible. The strips were dried at room temperature for 2 h before use.

As the use of prepared strips of paper offers poor handling and reproducibility when the sample is injected, we chose to cut the uranine paper into 10 mm \times 9 mm pieces and glue them with cellulose triacetate solution in dichloromethane in a 10 mm \times 4 cm transparent polyester strip. A higher signal was obtained when the width of the uranine anionic paper is 10 mm, the width of the optical cell. Additionally, the height of this paper on the polyester strip has some influence, being higher at 16 mm from the bottom; so, in face to PMT.

To study the influence of the uranine concentration of the soaking solution in the prepared test strip, we used solutions from 10^{-3} to 10^{-4} M with a constant soaking time of 5 min. The higher CL signal was obtained using 3×10^{-4} M (Fig. 2). The decrease observed at higher concentrations could be due to an autoabsorption of luminescence by uranine as suggested by the overlapping of diffuse reflectance and luminescence spectra of uranine in anionic paper. The use of higher soaking times using the same uranine solution leads to the same results, a decrease in the CL signal.

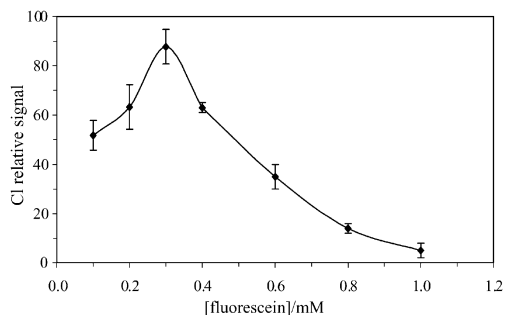


Fig. 2. Influence of fluoresceinate concentration on test strip.

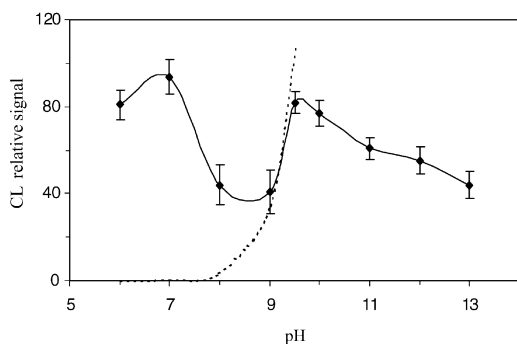


Fig. 3. pH dependence of CL test strip.

The CL-emission of hypochlorite with the use of this test strip is generated in the pH-range of 6–12, as is expected for an oxidant that works in alkaline media. The curve of the CL-emission with increasing pH shows two maxima, one at pH 7.0 and the other at pH 9.5; the CL-emission in the pH-range of 7.0–9.5 shows a minimum; there is an increase of CL-emission at the pH-range of 6.0–7.0 and a gradual decrease beyond pH 10.0–13.0 (Fig. 3). The two maxima may be due to the different processes involved. The formation of peroxyacid is more efficient at a pH where the parent carboxylic acid is fully dissociated ($pK_3 = 6.36$) and the hypochlorite is protonated ($pK_a = 7.53$) [17], which could account for the first maximum. The rise of the second maximum resembles the variation of $[ClO^-]/[HClO]$ ratio as a function of pH and could indicate that both hypochlorite species may be effective in producing the CL-species. Additionally, the production of singlet oxygen from peroxyacids is favoured at high pH values. A similar behaviour has been described for the oxidation of pyrogallol with hypochlorite [20]. It is possible to work at either of the two pH values (7.0 or 9.5), but (7.0 or 9.5) but the precision is higher working at pH 9.5, and thus this value was chosen.

The influence of the ionic strength is very high on the CL signal, producing an exponential decrease in the signal. Thus, the use of a 0.01 M in NaCl at the pH selected leads to a 78% decrease in the signal. This behaviour agrees with the results found for CL reaction of hypochlorite with uranine [21] and rhodamine 6G [16] in solution. The pH of the sample was adjusted to 9.5 with 0.1 M NaOH or 0.1 M HCl though not with a buffer because of the depressing influence of ionic strength on CL signal.

The sample volume influences the CL signal. For this study, we used four optical cells (1, 2, 5, and 10 mm), injecting volumes of 0.3, 0.7, 1.5, and 2.0 mL in such a way that in all cases the CL membrane was covered by solution. The CL signal rose up to 1.5 mL and then stayed constant because the increases in distance from membrane to PMT cancels the effect (the signal increased 3.5 times from 0.3 to 1.5 mL). Consequently, we used a 5 mm path width cell for subsequent experiments.

The use of manual injection with a conventional syringe led to results with poor reproducibility as was to be expected (at least relative standard deviation, R.S.D. 16%). To improve the reproducibility of the injection we designed a pneumatically operated automatic system (2 bar) to inject the sample into the CL chamber by means of a conventional syringe (R.S.D. 6%) (Fig. 1).

The CL response of the test strip to the hypochlorite concentration was studied between 10^{-5} and 10^{-2} M at pH 9.5. The dependence shows two linear stretches with different slopes, the first up to 2×10^{-4} M and then between 2×10^{-4} and 2×10^{-3} M with a lesser slope. For higher concentrations, the CL remains constant. These results are something similar to those found by Irons and Greenway [17] in the calibration of hypochlorite using rhodamine 6G as a reagent in a flow system, two stretches, the first exponential and the second linear. This can be explained by an energy pooling mechanism that overcomes the problem that one molecule of singlet oxygen does not carry sufficient energy to excite sensitising substances, as is the case. This mechanism predicted an exponential relationship between CL intensity and concentration at low levels of singlet oxygen and a linear relationship at high levels [22].

We observed that hypochlorite test strips are reusable without any special preparation except a brief immersion in water and a shaking off of any solution droplets. For intermediate concentrations (5×10^{-4} M) of the calibration function – we found that the test strips can be reused at least 30 times (Fig. 4). This is consistent with the proposed hypothetical CL mechanism because the fluoresceinate is not consumed, or only consumed in very small amounts, during reaction. Taking into account the ion exchange capacity of the support used ($1.7 \mu\text{Eq cm}^{-2}$), the amount of fluoresceinate anion fixed in the strip is $1.53 \mu\text{Eq}$, amount insufficient to explain its reuse.

The lifetime of the test strip, preserved in usual conditions when protected from light, was checked over 4 months without any variation in its precision, by using a series of prepared strips and regularly checking their response to a given analyte concentration (5×10^{-4} M).

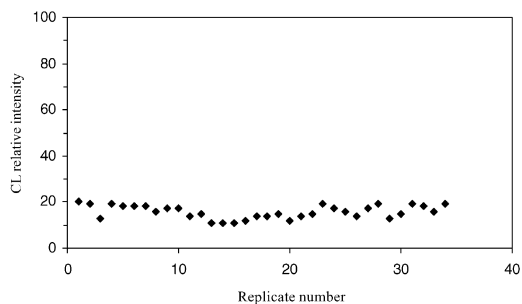


Fig. 4. CL value for replicate measurement using the same test strip.

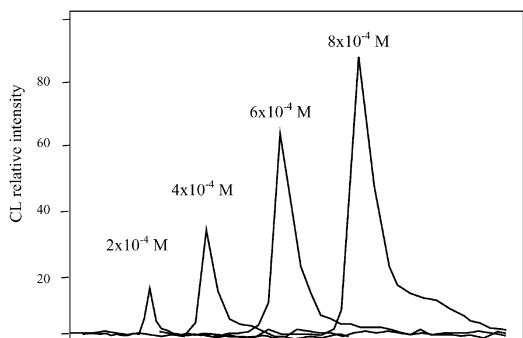


Fig. 5. CL records for different hypochlorite concentrations.

3.4. Analytical parameters

As analytical signals, height or area of the CL peaks can be used (Fig. 5), but the use of height produces better precision. The analytical functions were obtained by means of two sets of calibrations composed of 4 and 6 standards with six replicates of each standard. The linearity of the analytical curves was tested by applying a lack-of-fit test. Under the recommended conditions, there are two linear relationships between the analytical signal, i.e. CL intensity and hypochlorite concentration, the first over the range $2.0\text{--}10.3\text{ mg L}^{-1}$ (4×10^{-5} to 2×10^{-4} M) and the second from 10.3 to 51.4 mg L^{-1} (2×10^{-4} and 10^{-3} M). The IUPAC detection ($k = 3$) and quantification limits ($k = 10$) determined from ten blanks were 0.4 mg L^{-1} (8×10^{-6} M) and 1.5 mg L^{-1} (3×10^{-5} M), respectively.

The precision using the same disposable test strip, expressed as relative standard deviation, was obtained at a hypochlorite concentration of 4×10^{-4} M and 10 replicates of each one and has a value of 6.6%. The repeatability using different test strips was determined as above, using the same concentration and also 10 replicates of each one, and has a value of 12.3%. This value indicates that the precision in the construction of the strips represents the main contribution to the repeatability of the proposed procedure. Table 1 shows these and other analytical parameters.

Table 1
Analytical figures of merit

Parameter	Value
First linear range (M)	4×10^{-5} to 2×10^{-4}
r^2	0.995
Second linear range (M)	2×10^{-4} to 10^{-3}
r^2	0.992
Detection limit (M)	8×10^{-6}
Quantification limit (M)	3×10^{-5}
Cost (€/strip)	0.05
R.S.D. (%) intramembrane	6.6
R.S.D. (%) intermembrane	12.3

In order to check the effects of concomitant species commonly present in natural waters on the CL signal for hypochlorite, a study was carried out. Using a hypochlorite level of 5×10^{-5} and 5×10^{-4} M in concomitant species such as Ca(II), Mg(II), Zn(II), Cu(II), Fe(III), Cl^- , SO_4^{2-} , CO_3^{2-} , and NO_3^- , these species did not interfere, but NH_3 suppressed the CL signal due to chloramine formation. The presence of Fe(III) or Cu(II) prevents the interference of ammonia by catalysing the chloramine decomposition. An interesting feature of this test strip is the non interference of chloramines.

3.5. Application of the test strip

The accuracy of the method was established by means of a recovery study in waters with different degrees of mineralization spiked at two concentration levels of hypochlorite. Table 2 shows the recovery rates obtained, which ranged between 91.0 and 103.4%. In order to assess the usefulness of the proposed chemiluminescent test strip for the determination of hypochlorite, it was applied to its determination in different types of waters (industrial, well, and swimming pool) samples. Table 3 shows the results obtained using the proposed test strip and the DPD spectrophotometric methods [23]. This table includes the mean values from three determinations of each sample, standard deviations of these measurements and the probability value (P_{val}) of the test used for the comparison of the results obtained for both methods. As can

Table 2
Recovery study

Mineral water	Added (mM)	Recovery (mM)	Recovery (%)
Gerona, Spain (strong)	0.30	0.28	93.3
	0.50	0.47	95.4
Cordoba, Spain (weak)	0.30	0.29	98.0
	0.50	0.52	103.4
Gerona, Spain (weak)	0.25	0.24	97.1
	0.55	0.56	102.1
Madrid, Spain (very weak)	0.30	0.29	99.7
	0.50	0.45	91.0

Table 3
Determination of hypochlorite in waters by proposed and reference procedures

Matrix	Test strip (mg/L)	S	Reference method (mg/L)	S	P_{val} (%)
Swimming pool water 1	4.9	0.5	4.6	0.3	52.1
Swimming pool water 2	5.0	0.6	5.2	0.3	64.6
Cooling water 1	21	2.3	23	1.3	23.3
Cooling water 2	28	3.6	29	2.3	84.3
Well water 1	9.0	0.8	9.3	0.5	64.5
Well water 2	7	1.0	6.1	0.4	35.5

be seen, the results obtained for both methods are statistically similar.

4. Conclusion

A simple and selective chemiluminescence test strip for the determination of hypochlorite in water has been proposed. The test strip comprises a membrane of anion exchange paper in fluoresceinate cycle affixed to an elongated support member which serves as a convenient handle. The test strip procedure offers sufficiently good repeatability, can be reusable, is simple to prepare and use, is environmental friendly due to its low disposal and may be considered as an inexpensive alternative for obtaining analytical information.

Acknowledgements

We acknowledge financial support from the Ministerio de Educación y Cultura, Dirección General de Enseñanza Superior (Spain) (Project No. BQU2002-00353) and Plan Propio de la Universidad de Granada (2002-30PP000500).

References

- [1] L.F. Capitán-Vallvey, M.D. Fernández-Ramos, Solid-phase spectrometric assays, in: S. Alegret (Ed.), *Integrated Analytical Systems*, Elsevier Science B.V, Amsterdam, 2003, p. 81.
- [2] A. Hasegawa, Chemiluminescent analytical test strip and holder, Patent no. JP 08184595 (1994).
- [3] O.S. Khalil, T.F. Zurek, K.R. Genger, P.J. Curtis, Y.H. Jou, S.M. Cotter, Method and apparatus for heterogeneous chemiluminescence assay, Patent no. US 5,089,424 (1992).
- [4] S. Furuya, T. Imai, N. Hiratsuka, T. Ikeda, A. Kondo, Integral multilayered analysis elements and their use in body fluid analysis for clinical diagnosis, Patent no. JP 62103542 (1986).
- [5] P.O. Vogelhut, Chemiluminescent analytical device, Patent no. US 4,231,754 (1980).
- [6] R.T. Belly, M.M. Kopcieski, C. Erdrich, M.A. Kildal, Format for immunoassay in thin film, Patent no. US 5,958,339 (1999).
- [7] H. Akhavan-Tafti, K. Sugioka, Y. Sugioka, L.V. Reddy, Chemiluminescent detection methods using dual enzyme-labeled binding partners, Patent no. US 5,843,666 (1998).
- [8] L.A. Liotta, B.C. Christiansen, A.R. Day, T. Harlacher, K. Paweletz, Light-emitting immunoassay, Patent no. US 5,942,407 (1997).
- [9] T.R. Kissel, A.E. Friedman, S.A. Fingar, Chemiluminescent reagent and assay using a substituted acetanilide for light generation, Patent no. US 5,705,357 (1998).
- [10] M.Y. Rubtsova, J.V. Samsonova, A.A. Ezhov, A.M. Egorov, Bioluminescence and Chemiluminescence: Progress and Current Applications, Proceedings of the Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence, 12th, Cambridge, United Kingdom, 5–9 April 2002, p. 403.
- [11] M.Y. Rubtsova, C. Wittmann, A.M. Egorov, R.D. Schmid, Food Agric. Immunol. 9 (1997) 235.
- [12] V.V. Ramana, K.R. Yamuna, I. Jaunakais, Test strip for free chlorine analysis, Patent no. US 5,491,094 (2001).
- [13] W.H. Wu, I.N. Elkhart, Low range total available chlorine test strip, Patent no. US 5,976,823 (1999).
- [14] W.H. Wu, Peroxide and chlorine test strip, Patent no. US 6,087,089 (2000).
- [15] K. Seiler, W. Simon, *Anal. Chim. Acta* 266 (1992) 73.
- [16] T. Nakagama, M. Yamada, T. Hobo, *Analyst* 114 (1989) 1275.
- [17] G.P. Irons, G.M. Greenway, *Analyst* 120 (1995) 477.
- [18] I. Kamiya, K. Aoki, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 47 (1974) 1908.
- [19] I. Kamiya, S. Kato, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 43 (1970) 1287.
- [20] N.P. Evmiridis, N.K. Thanasoulis, A.G. Vlessidis, *Talanta* 46 (1998) 179.
- [21] T. Nakagama, M. Yamada, T. Hobo, *Anal. Chim. Acta* 231 (1990) 7.
- [22] E.A. Ogryzlo, A.E. Pearson, *J. Phys. Chem.* 72 (1968) 2913.
- [23] L.H. Keith, *Compilation of EPA's Sampling and Analysis Method*, CRC Press Inc., Boca Raton, FL, 2000.

available at www.sciencedirect.comjournal homepage: www.elsevier.com/locate/aca

One-shot lactate chemiluminescent biosensor

J. Ballesta-Claver, M.C. Valencia-Mirón, L.F. Capitán-Vallvey*

Solid Phase Spectrometry Research Group, Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Granada, Campus Fuentenueva, Granada E-18071, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 May 2008

Received in revised form

5 September 2008

Accepted 10 September 2008

Published on line 17 September 2008

Keywords:

Lactate determination

Biosensor

Chemiluminescence

One-shot biosensor

Yoghurt analysis

ABSTRACT

A new chemiluminescence-based one-shot biosensor for lactate is described. The lactate recognition system is based on lactate oxidase (LOx) and the transduction system consists of luminol, peroxidase from *Arthromyces ramosus* (ARP) and metallic aluminum, all immobilized in a polyion complex membrane. The measurement of the chemiluminescence in a luminometer when 1 mL of sample is injected into a conventional cell containing the disposable sensing membrane makes it possible to determine lactate. The compositions of the membrane and reaction conditions have been optimized to obtain adequate sensitivity. The one-shot biosensor responds to lactate rapidly, with the typical CL acquisition time being 2 min, with a linearized logarithmic dependence whose dynamic range was from 5×10^{-5} to 4×10^{-3} with a detection limit of 9.2×10^{-6} M and a sensor-to-sensor reproducibility (relative standard deviation, R.S.D.) of 5.5% at the medium level of the range. The performance of the chemiluminescent one-shot biosensor was tested for the analysis of lactate in yoghurt, validating the results against an enzymatic reference procedure. The proposed method is quick, inexpensive and sensitive and uses conventional CL instrumentation.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

L(+)-Lactate is produced in the anaerobic metabolism of glucose and its determination is of interest in clinical analysis, sports medicine and food analysis. The measurement of lactate is routinely performed with liquid chromatography [1], spectrophotometry [2] and amperometry, mainly with enzymatic electrodes [3]. Lactate analysis is needed in different fields such as food, sports medicine and health. In foodstuffs, lactate is produced by bacterial fermentation and is an essential component related to the manufacture of cheese, yoghurt, milk, and more, making monitoring lactate an important quality control parameter.

The rapid evaluation of blood lactate levels that are needed to determine the optimal workload for athletes, soldiers or workers in the field or to evaluate patients or animals in a point of care unit, can be performed with one-shot sensors

[4]. Different types of one-shot sensors have been described for lactate and some of them are on the market, especially the fitness market, for use with portable handheld monitors, small benchtop monitors and freestanding monitors [5].

Most of the one-shot sensors described for lactate are based on enzymatic dry chemistries, on the usual basis of lactate oxidase (LOx) [6] and lactate dehydrogenase [7] with photometric [8] or amperometric transduction [9,10]. The chemiluminescent (CL) transduction [11] commonly based on enzymatic schemes, mainly lactate oxidase/peroxidase/luminol [12] and lactate dehydrogenase/NADH/bioluminescent enzymes [13] have been implemented in different types of flow [14,15] or fiber optic formats [12]. However, chemiluminescent detection has been used to a much lesser extent in one-shot sensors despite its advantages of high sensitivity and simple instrumentation, because of the more complex immobilization of

* Corresponding author. Tel.: +34 958248436; fax: +34 958243328.

E-mail address: lcapitan@ugr.es (L.F. Capitán-Vallvey).

0003-2670/\$ – see front matter © 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

doi:10.1016/j.aca.2008.09.028

all the chemistries needed and the need of time control of CL measurement.

Chemiluminescent one-shot sensors described up to date are mainly enzymatic or immunological and the CL measurement is carried out by a luminometer [16,17], a portable scanning luminometer [17] or different types of photographic films, especially instant photographic film [18–20], with a densitometer or a scanner [21] or even including the photographic film in the analytical element as a photoresponsive layer [22].

Different enzymatic chemiluminescent one-shot sensors have been described that typically are multilayered elements containing the immobilized reagents. These reagents can be located: (1) in one reagent layer as the described glucose sensor containing luminol, glucose oxidase and peroxidase in a mixture of gelatine and 1,2-bis(vinylsulfonylacetyl)ethane [23] or encapsulated in osmosensitive microcapsules to improve their lifetime; and (2) in several layers, as is the case with a described glucose sensor with enzymes in a micro-fiber glass disk and luminol in a cellophane membrane studied by Carter et al. [18].

One example of a non-enzymatic one-shot sensor has been proposed for hydrogen peroxide in rainwater based on a membrane of hydroxyethyl cellulose containing cobalt chloride as a catalyst and a surfactant [24].

Different heterogeneous and homogeneous chemiluminescent one-shot immunoassays have been described including nucleic acid hybridization assays, immunochemical assays such as sandwich assays, competitive binding assays and direct binding assays.

In the case of this heterogeneous assays the separation of unbound label compounds as well as interfering sample components from the reaction zone prior to the CL measurement can be accomplished by washing and removing the washing liquid with an adjacent absorbent layer. The application of a solution detection chemistry (luminol, hydrogen peroxide, surfactants, enhancers) triggers the CL reaction [16,17,25–27]. Alternatively, after washing the unreacted label from the membrane, a piece of paper wetted with CL chemistry can be placed next to this membrane to unleash CL emission [28]. In the case of homogeneous formats, a three-zone sensor is proposed. The second zone traps the unreacted labeled ligand coming from the first zone. The third zone contains the chemistry necessary to trigger the CL response [29].

The use of these one-shot chemiluminescent sensors is widespread and examples have been cited for hydrogen peroxide [24], hypochlorite [30], glucose [18,23], theophylline [29], the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid [28], the herbicides atrazine, terbutylazine and ametryn [16], 4-nonylphenol [17], human chorionic gonadotropin [27], and DNA hybridization assays [19,26], among others.

The aim of this study was to develop and characterize an one-shot chemiluminescent biosensor for lactate, selecting yoghurt as an interesting and representative application, based on the generation of hydrogen peroxide by the couple lactate oxidase and peroxidase in the presence of metallic aluminum and subsequent reaction with luminol, which includes all the reagents and processes needed for the assay in one single membrane.

2. Experimental

2.1. Chemicals

All chemicals used were of analytical-reagent grade. Reverse-osmosis type quality water (Milli-Q Plus185 from Millipore S.A.S 67120, Molsheim, France) was used throughout. L-(+)-Lactate 10^{-2} mol L⁻¹ stock solutions in water were prepared using L-(+)-lactate lithium salt 97% from Sigma (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, Spain) which was standardized by iodimetry. Solutions of lower concentrations were prepared by dilution with water. Other solutions used were Tris 0.1 M buffer from Trizma base 99% (Sigma) which were adjusted to different pH by adding NaOH or HCl.

The CL reaction were carried out by the following reagents: 10^{-2} M luminol (5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione) stock solution from 97% (Sigma), lactate oxidase (LOx) from *Streptococcus species*, 39 IU mg⁻¹, from Sigma, peroxidase from *Arthromyces ramosus* (ARP), 758 IU mg⁻¹, from Fluka (Fluka, Madrid, Spain) and powder aluminum metal (<75 μ m particle size) from Sigma.

For membrane making we used D4 and D6 polyurethane hydrogel, 60 g L⁻¹, from Tyndall-Plains-Hunter Ltd. (Ringo, NY, USA); polyvinyl triacetate, cellulose triacetate, the polycation poly-L-lysine (PLL) hydrobromide (MW 84,000 g mol⁻¹) and polyanion poly(sodium 4-styrenesulfonate) (PSS) (MW 70,000 g mol⁻¹) 30 wt% (density 1.16 g mL⁻¹) solution in water, all supplied by Sigma. As support for membranes we used sheets of Mylar-type polyester (Goodfellow, Cambridge, UK), both transparent and also opaque colored sheets and a metallized plastic mirror. Additional chemicals were tetrahydrofuran (THF), as a solvent, and the anion-exchange resins Sephadex QAE-25 and DEAE, and IRA 400 chloride form, all supplied from Sigma.

2.2. Enzyme preparation

The LOx solution was prepared taking 1.40 mg into a 1 mL of pH 8.8 Tris buffer 0.1 M and conserved in Eppendorf tubes (60 μ L) at -20° C. For ARP preparation, 0.22 mg was taking in 100 μ L of pH 8.8 Tris buffer 0.1 M and conserved in Eppendorf tubes at -20° C.

2.3. Apparatus and software

CL emission was measured using a CL-1 Camspec luminometer equipped with an external chamber for CL measurement using standard UV-visible cells, previously described [30]. This accessory consists of a metallic rectangular box with a built-on cell holder. The 12 mm wide cell holder is made of a matte black painted iron block that closes with a metallic lid to prevent external light from entering. The PMT is next to the cell and a switch makes the measurement possible. The cell lid has a central hole for sample introduction by means of a 6 cm PVC tube painted black. The whole accessory is shut with a black metallic cover that has a hole similar to that of the cell lid. To check the accessory, a LED-based test system was used. The luminometer was interfaced to a Pentium III microcomputer via an INT7—24 bit A/D Integration board for luminescence

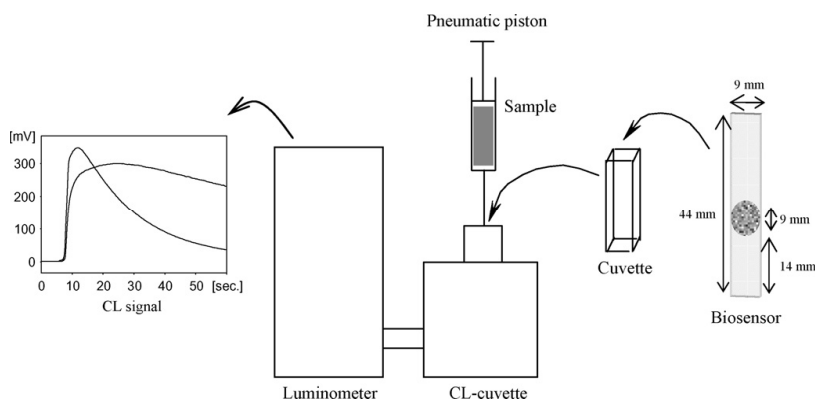


Fig. 1 – Instrumental setup for lactate determination.

acquisition and subsequent manipulation of data. The introduction of the sample in the luminometer was made by means of a conventional syringe of different volume with a double-acting pneumatic system designed by us (Fig. 1) to improve the reproducibility of the measurements.

Other apparatus and laboratory materials consist of a laboratory-made spin-on device [31], a Crison digital pH-meter (Crison Instruments, Barcelona, Spain) with combined glass-saturated calomel electrode and Hellma OS and QS 100 cells with 1, 2, 5 and 10 mm light path.

Software programs used for the treatment of the data were: CSW32 software package supplied by DataApex Ltd. v 1.2.5 (2001) (Prague, Czech Republic) used for the acquisition and manipulation of the luminescence data; Statgraphics software package (Manugistics Inc. and Statistical Graphics Corporation, USA, 1992), ver4.0 (1993).

2.4. Membrane preparation

The lactate-sensitive membranes were produced from a cocktail containing all the chemicals on a polyester substrate using a spin-coating technique. For the preparation of the cocktail the following procedure was used: to 3.50 mg of luminol were added 200 μL of 2×10^{-2} M NaOH in a 3 mL glass vial and this was ultrasonically treated for 15 min. Then, 1753 μL of pH 8.8 Tris buffer 0.1 M were added to the vial and shaken just 1 min and consecutively 1.68 mg of PLL, 9 μL of ARP peroxidase ($15,500 \text{ IU L}^{-1}$) and 57 μL of LOx (710 IU L^{-1}) were added and shaken a minute after each addition. Finally we mixed 28.6 μL of an ultrasonicated solution for 5 min containing 10^{-4} M PSS and a mixture of dispersed powdered aluminum 2.96×10^{-3} M. The vial containing all chemicals was shaken for 2 min before use.

The disposable biosensors were cast by placing 30 μL of the cocktail prepared previously by a micropipette on a 9.0 mm \times 44 mm \times 0.5 mm dust-free thick transparent polyester sheet using a homemade spin-coater [31] rotating at 90 rpm. After spinning for 1 min, the membrane was removed from the spin coater and dried at room temperature for 4 h and then stored in refrigerator at 4 $^{\circ}\text{C}$. The sensing area of the disposable biosensor is a 9 mm of diameter translucent circ-

lar film with a calculated thickness about 6 μm , considering the membrane as a cylinder and the density of the chemicals.

2.5. Procedures

2.5.1. Procedure for samples and standards

An aqueous standard solutions of lactate containing between 5×10^{-5} and 4×10^{-3} M in lactate with the pH adjusted to 8.8 with Tris buffer 0.1 M, was taken in a 1 mL syringe. A lactate-sensitive biosensor was placed on a 5 mm cell in front off the PMT of the cell holder of the luminometer external chamber. After closing the external chamber with the two lids, the sample was injected into the cell through the PVC tube by means of the syringe driven by a pneumatic piston, then measuring the CL emission without wavelength discrimination.

2.5.2. Reference procedure

As a reference procedure we used the enzymatic bioanalysis Boehringer Mannheim UV-Kit method from r-Biopharm AG (ATOM S.A., Barcelona, Spain) [32] for the determination of L-lactate in foodstuffs and other materials. The sample preparation used consists of mixing 2 g of yoghurt with 98 mL of water with an electric mixer, filtering and using 0.10 mL of the filtrate for the assay.

2.5.3. Treatment of samples

For the analysis of yoghurt samples, an adequate amount (typically 2 g) was weighed, mixed and homogenized with 200 mL of water and then filtered the solids through a conventional filter of paper (0.217 mm thick with 20–25 μm pore size) (Albet, Valencia, Spain). Then the procedure previously described was applied.

3. Results and discussions

3.1. Immobilization of the reagents for the recognition chemistry

The first step for the study of this one-shot chemiluminescent biosensor for lactate based on the atmospheric oxidation

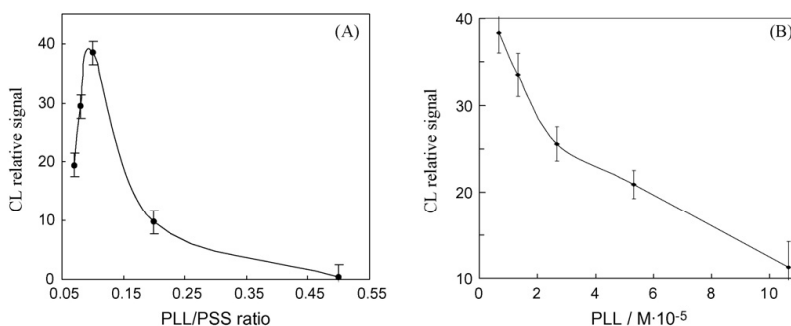


Fig. 2 – Influence of the composition of polyion complex membranes on light intensity. (A) PLL/PSS molar ratio in forming complex polyion membranes; (B) influence of PLL concentration at 0.1 PLL/PSS ratio. Each point was replicates five times with new biosensor each.

of lactate catalyzed by LOx and the subsequent reaction of hydrogen peroxide with luminol in basic medium catalyzed by peroxidase is to prepare a membrane containing all of the reagents needed to make the lactate recognition possible.

To include all these reagents in a membrane, we tested different immobilization systems; namely, (1) entrapment using D-4 and D-6 polyurethane, PVA and cellulose acetate; and (2) ion-exchange using polyion complex layer. The relative CL signals obtained were very different: PVA (0.4%), cellulose acetate (1.3%), D6 (0.1%), D4 (0.8%), and polyion complex (100%). The best results were obtained using a polyion complex membrane formed by reacting a linear polycation, such as poly-L-lysine, in the presence of anionic LOx, with a linear polyanion, such as poly-4-styrenesulfonate [33].

We initially tested two possible membrane arrangements: (1) a two membrane configuration with one membrane containing the lactate recognition chemistry – LOx – and the other containing the CL transduction – ARP and luminol –; and (2) only one membrane containing all reagents. Although it has been described that enzyme compartmentalization improves the performance of the sensor [34], we did not succeed preparing a two layer configuration efficiently using the polyion complex. Consequently, we included all the reagents in a single membrane.

The peroxidase selected was *A. ramosus* instead of horseradish peroxidase (HRP), due to its faster catalysis [35] because ARP binds luminol in specific sites [36].

In all cases the membranes were prepared from solutions of polymers and reagents in a solvent which are cast on a support with a spin-coating technique. We tested different types of solid supports for the sensing layer: transparent colorless and different opaque colored polyester and metallized plastic mirror in order to increase the CL signal, but the results were very similar in all cases. Then, we chose the transparent polyester strip as a convenient support.

We observed that signal produced by the sensing membrane using the polyion complex is two times higher than the same reaction in solution using the same reagents and experimental setup.

3.2. Optimization of lactate one-shot biosensor composition

Once the membrane materials had been selected, we studied different factors related to the membrane making, including the concentration of chemicals and membrane polymers. All these factors were studied univariantly. In all cases the parameter to optimize was the CL relative signal, that is, the CL signal for lactate subtracting the CL background produced in the absence of lactate.

The first factor to consider when preparing the membranes is the pH of the cocktail used to make the membranes. As the pH for maximum enzymatic activity of LOx (pH 7.5 [37]) and ARP (pH 9.5 [38]) are quite different, an 8.8 pH buffer is used first for the subsequent study as a compromise for optimum enzymatic activity and stability. The optimization of the working pH is studied in Section 3.3 below. The initial enzyme concentrations used according to the literature were: 15,500 IU L⁻¹ for ARP [37], and 140 IU L⁻¹ for LOx [39].

3.2.1. Polyion complex layer composition

The mixture of PSS and PLL produce a white precipitate that forms a membrane by evaporation. To find the best composition we studied the molar ratio PLL to PSS. Two solutions containing LOx, ARP, with luminol along with PLL in one of them, and PSS in the other were used, preparing different membranes on a Mylar polyester support by mixing different volumes, casting with a spin-on device system, and measuring the CL emission at 4×10^{-4} M lactate (Fig. 2A). The best PLL/PSS ratio is 0.1 which can be related to: (1) the electric charge of the membrane; thus, the PLL must be in excess to electrostatically interact with all the anionic reagents – LOx, ARP and luminol – and at the same time offer a positively charged membrane to allow the permeation of lactate; and (2) the thickness of the membrane which increases with the PLL/PSS ratio slowing the entrance of the lactate and hence decreasing the signal. A lower ratio than 0.1 produces brittle membranes and worse responses.

To study the dependence of the thickness of the membrane (between about 5 and 100 μ m), a number of biosensors

were prepared with the optimum PLL/PSS ratio (0.1) but using different polymer concentrations. It was observed that the higher the polymer concentration, and thus a higher thickness, the lower the CL relative signal is (Fig. 2B). We selected 1.33×10^{-5} M in PLL and 9.52×10^{-7} M in PSS solutions for the preparation of the sensing membranes; due to the increase in the signal (13%) and the speed of the response (32%) observed with respect to the maximum values shown in Fig. 2A, concentrations less than the above cannot be used because they produce brittle membranes that dissolve in contact with any solution.

3.2.2. LOx and ARP influence

To optimize the concentration of both enzymes, we prepared one-shot biosensors using a constant ARP concentration, at a usual value of $15,500 \text{ IU L}^{-1}$ [35], and modified the LOx concentration between 140 and 1000 IU L^{-1} . Then, and using the optimum LOx concentration found, we studied the ARP influence between 1500 and $110,000 \text{ IU L}^{-1}$. Taking into account the K_m constants (K_m ARP: 7×10^{-6} M [35], K_m LOx: 9.3×10^{-3} M [38]) and the concentration of both enzymes ($[\text{ARP}] > [\text{LOx}]$), we confirmed, considering the Michaelis-Menten equation, that LOx becomes the limiting factor, producing a more sensitive lactate biosensor. Fig. 3A shows the results obtained for both enzymes. The CL increases with LOx concentrations up to 710 IU L^{-1} . Then, the CL relative value reaches a plateau due to an excess in enzyme concentration with respect to the substrate. In the case of ARP, a maximum in the CL relative signal is observed which then decreases as a consequence of the contribution of the blank signal, which increases with ARP

concentration, decreasing the CL relative signal, because of a reaction between luminol and ARP [40]. The optimum enzymatic charge in the membrane corresponds to 0.021 IU LOx and 0.46 IU ARP .

3.2.3. Luminol dependence

The CL relative signal increases with luminol concentration (Fig. 3B) up to 10^{-3} M, decreasing then slightly. This fact has been described for CL in solution [37,41] and justified by Misra and Squatrito [42] as due to the accumulation of products or dismutation of reactive intermediates rather than the depletion of reagents.

3.2.4. Aluminum role

We observed that the incorporation of powdered aluminum metal (Al) into the membrane increases the CL relative signal. Thus, the use of a small Al amounts in the membrane induces the magnitude enhancement in the CL relative signal more than two orders and reduces the experimental errors without increasing the blank signals. To optimize the Al content we prepared different biosensors containing dispersed Al particles (diameter $< 75 \mu\text{m}$) ranging from 5.9×10^{-5} to 4.7×10^{-4} M. An increase in CL relative signal with Al concentration is observed up to 1.2×10^{-4} M, decreasing then (Fig. 3C). Thus, this concentration was used afterwards, which meant a molality of 1.82×10^{-6} m in Al in the dry thin sensing membrane. At Al concentrations in molarity higher than 1.2×10^{-4} M, the CL emission slows down. In order to clarify this phenomenon, Fig. 4 has been included, which shows only the CL emission of Al at higher concentrations (the blanks are not represented

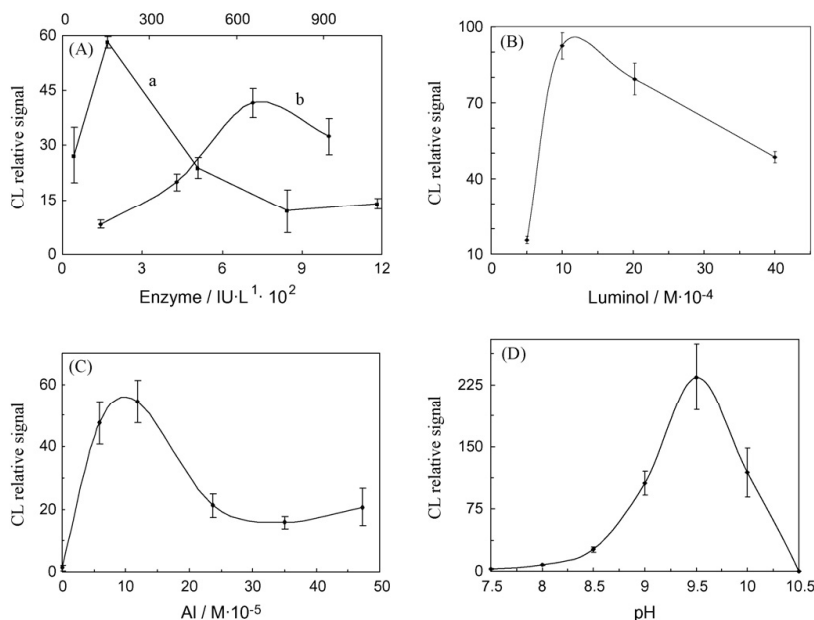


Fig. 3 – Effect of enzymatic contribution to CL relative emission signal. (A) The ARP curve (a) reaches a maximum at $15,500 \text{ IU L}^{-1}$ decreasing then. The LOx curve (b) increases with concentration given a plateau at 710 IU L^{-1} . (B) Luminol dependence. (C) Aluminum dependence. (D) pH dependence. Each point was replicates five times with new biosensor each.

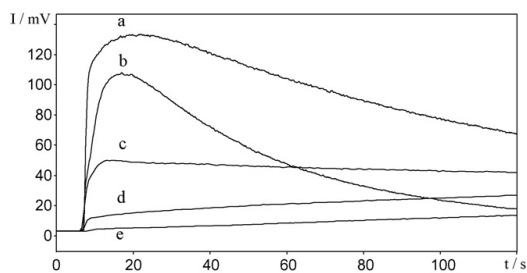


Fig. 4 – Effect of Al concentration in membrane on CL emission at pH 8.8. (a) 1.2×10^{-4} M Al; (b) 10^{-3} M Al; (c) 10^{-2} M Al; (d) 10^{-1} M Al; (e) membrane prepared on an Al plate.

but they decrease the same way as the lactate signals). It is easy to see that there is a change in the emission pattern with a progressive decrease in CL emission (Fig. 4, curves a–e) suggesting a major contribution of one of the three reactions that take place in the medium (lactate to pyruvate by LOx; luminol–ARP– H_2O_2 ; luminol–Al– H_2O_2). The reaction that is intensified is the slow luminol–Al– H_2O_2 reaction, as described by Kulmala et al. [43], which is explained in more detail later in the paragraph on the CL mechanism.

3.2.5. Biosensor preparation

The composition of the sensing membrane discussed above was studied preparing the biosensors with 20 μ L of cocktail in a spin-on-device system. The use of different volumes (10–40 μ L) of optimized cocktail means an increase of some 23% in the CL signal and change the relative standard deviation (R.S.D.) values from 12.4% (10 μ L) to 3.0% (30 μ L). The R.S.D. is reduced some 75%, thus increasing the precision. 30 μ L was therefore chosen to prepare the sensing membrane because the use of higher volumes exceeds the size of the plastic support used.

3.3. Optimization of experimental conditions

The pH dependence (Fig. 3D) shows maximum CL emission at 9.5 working at a constant lactate concentration (10^{-4} M). However, the variation in the CL relative signal with the lactate concentration is very low at this pH because a small discrimination between different lactate concentrations is observed. Additionally, the R.S.D. at this pH is high (25%). The use of a lower pH gives lower CL relative signals but better sensitivity for lactate, with the optimum pH being at 8.8 if we take into account the contribution of the standard deviation of the CL signal (see error bars in Fig. 3D). The selected pH was 8.8 considering sensitivity and the S/N ratio and was adjusted with Tris buffer due to better lactate discrimination. The explanation for the higher signal observed at pH 9.5 is due to the higher enzymatic activity of ARP at this pH [28,44]. Additionally at this pH, the production of H_2O_2 catalyzed by LOx is very low, but the efficiency of the luminol–ARP reaction is very high because of the enzyme and also because of the luminol, whose reactivity increases with pH up to pH 11 [37].

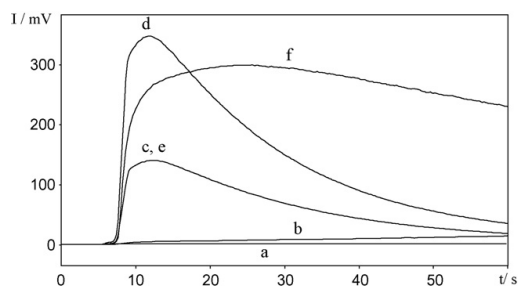


Fig. 5 – Effect of membrane composition on CL emission. (a) Al and luminol plus buffer; (b) Al and luminol plus lactate; (c) ARP and luminol plus buffer; (d) ARP and luminol plus lactate; (e) ARP, luminol and Al plus buffer; (f) ARP, luminol and Al plus lactate. All the membranes include LOx (710 IU L^{-1}). In all cases the concentrations were: Al 1.2×10^{-4} M; ARP 15,500 IU L^{-1} ; luminol 10^{-3} M and lactate 6×10^{-4} M.

The dependence of Tris buffer concentration in the membrane was studied between 10^{-4} and 0.1 M, showing a decreasing in the CL relative signal with the precision worsening when the buffer concentration increases. This decrease was described by Sakharov [45] working with peroxidases like ARP and HRP in solution. As a compromise solution for higher signal and precision, we chose 10^{-2} M buffer. Similarly, the same effect is observed when salts, such as NaCl, increase their concentration from 10^{-4} to 0.1 M. Both behaviors could be explained by an osmotic pressure effect; that is, at a high concentration of salts in the sample solution, the polyion membrane lowers the lactate entrance, generating a weaker CL emission.

To study influence of the sample volume, we used four optical cells (1, 2, 5, 10 mm) with the biosensor membrane placed on the side far away from the PMT, and injecting sample volumes of 0.3, 0.7, 1.0, and 2.0 mL, respectively, in such a way that in all cases the CL biosensor was covered by the solution. The CL relative signal rose up to a volume of 1 mL staying constant at higher volumes, because the increases in distance between the membrane and the PMT cancel the effect. Thus, we selected a 5 mm path width cell for the rest of the study. In all cases and to increase the precision of the injection of the sample, we use a pneumatically operated automatic system (2 bar) to inject the sample into the CL cuvette by means of a conventional syringe [30].

The reuse of the same membrane with new lactate solution provides decreasing CL readings of some 25% each time, for which reason the membrane is only appropriate for one-shot use.

3.4. Characteristics of CL signal

The injection of a blank solution containing only pH 8.8 Tris buffer in the cuvette housing the disposable membrane, generates an initial CL signal (<5 s) that decreases over time to disappear (Fig. 5e). In the case of lactate containing solution, the initial signal is typically more intense, although

with low precision, and maintains over time up to some 30 s decreasing then slowly (Fig. 5f). In order to obtain the best CL relative signal, that is the CL lactate signal (Fig. 5f) subtracting the CL background produced in the absence of the analyte (blank) (Fig. 5e), we studied its evolution over time in the presence and absence of lactate showing maximum at 30 s, although the acquisition at 2 min improves the precision.

3.5. CL mechanism

When the lactate membrane (containing luminol–LOx–ARP) comes into contact with the pH 8.8 buffer, an initial CL emission is observed that decays to a steady state signal (Fig. 5c). This blank could be explained by the reaction of luminol with ARP due to traces of oxidants such as Compound I in the ARP and/or peroxides in the luminol [40,46].

The introduction of lactate in the membrane produces the oxidation of the lactate to pyruvate because of the oxygen catalyzed by LOx produces H_2O_2 which slowly reacts with luminol with concomitant CL emission (Fig. 5d). The use of peroxidases such as ARP catalyzes the luminol oxidation through a three-step pathway [37] that concludes in the formation of an excited 3-aminophthalate dianion which finally produces CL, enhancing the light emission [47].

The inclusion of powdered metallic aluminum in the sensing membrane improves the CL relative signal [48]. Therefore, in the presence of ARP and metallic Al, a fast CL emission occurs that is maintained over time (Fig. 5f). This growth in CL emission by Al could be related to the more efficient turnover of ARP through the reactive intermediate Compound I production by radicals generated from H_2O_2 by Al. Fig. 5e shows the effect of Al on the blank. The introduction of Al into the membrane does not increase the blank signal because Al only reacts in the presence of H_2O_2 , confirming the mechanistic role of Al.

In the absence of ARP but in the presence of Al, the CL blank emission does not work at pH 8.8 [43] (Fig. 5a); even though with the H_2O_2 formed by LOx at the expense of the lactate, only a slight emission occurs that cannot be compared with CL in the presence of ARP (Fig. 5b).

3.6. Analytical parameters

The analytical function was obtained by means of a calibration set composed of five standards with five replicates of each standard between 5×10^{-5} and 4×10^{-3} M and using 30 s and also 2 min (Fig. 6, curves g and h) as acquisition time. The observed dependence between the CL relative signal and lactate concentration in both cases (30 s and 2 min) is a logarithmic curve that was linearized using: $I = A \times \log[\text{lactate}] + b$. The sensitivity is higher by a factor of 2.5 when an acquisition time of 30 s is used (Table 1).

This observed analytical function is not common with lactate sensors. Generally, a linear analytical function for lactate is reported in FIA or SIA procedures [18,49,50] and a log–log dependence is described in fiber optical sensors with immobilized enzymes [34,51].

As the calibration function is logarithmic, the detection limits were obtained using the standard criteria [52]

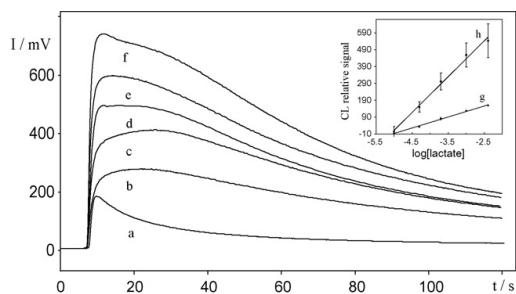


Fig. 6 – Calibration curves. CL measurement curves from different lactate concentrations: (a) blank; (b) 2×10^{-4} M; (c) 6×10^{-4} M; (d) 8×10^{-4} M; (e) 10^{-3} M; (f) 2×10^{-3} M; (g) linearization graph at 30 s representing CL relative signal ($y_{\text{lactate}} - y_{\text{blank}}$) vs. lactate concentration logarithm; (h) linearization graph at 2 min representing CL relative signal ($y_{\text{lactate}} - y_{\text{blank}}$) vs. lactate concentration logarithm.

$DL = y_b + 3s_b$, where y_b is the average blank signal and s_b is the standard deviation of blank, which was determined from 10 blanks (R.S.D. 5%). The detection limits found were 9.2×10^{-6} and 3.5×10^{-5} M for 2 min and 30 s acquisition time, respectively, due to different precisions obtained in both cases.

The repeatability, as relative standard deviation, obtained using 10 different one-shot biosensors at different lactate concentrations was around some 3–8% at 2 min and 10–15% at 30 s. Taking into account the precision figures, we preferred to use 2 min as acquisition time for this lactate one-shot biosensor.

The lifetime of the one-shot biosensor, kept away from the light and protected at 4°C , was studied by using a series of prepared biosensors and regularly checking their response to an analyte concentration of 4×10^{-4} M. The lifetime obtained was over 1 month (average signal 33.8 ± 2.4 ; decreasing at 22 days: 1.0%; at 30 days: 10.1%; at 35 days: 45.6%, at 45 days: 95.1%), which is acceptable for this type of biosensor and coincides with the long-term stability study of amperometric lactate biosensors based on LOx immobilized in the same membrane used here [33]. The cost of the biosensor considering only reagents and support to make the membrane is around 0.06 € unit^{-1} .

The performance characteristics of the biosensor developed here and different sensors for determining lactate are compared in Table 2.

Table 1 – Analytical parameters

Parameter	Value t 30 s	Value t 2 min
Linear range (M)	5×10^{-5} – 4×10^{-3}	5×10^{-5} – 4×10^{-3}
Ordinate	953.1	320.1
Slope	168.3	65.4
r	0.971	0.998
Detection limit (M)	3.5×10^{-5}	9.2×10^{-6}
R.S.D. (%) blank	10.4	5.0
R.S.D. (%) lactate (8×10^{-4} M)	12.3	5.5

Table 2 – Comparison of lactate sensor characteristics

Sensor	Range (M)	DL (M)	Precision (%)	Application	Reference
CL FIA	10^{-4} – 1.5×10^{-3}	1.2×10^{-5}	1.9	Yoghurt	[39]
Amperometric electrode	3×10^{-4} – 10^{-3}	10^{-6}	2.0	Serum and milk	[33]
CL FIA fiberoptic	8×10^{-5} – 2.5×10^{-2}	4×10^{-5}	1.7	Dairy products	[34]
Amperometric screen printed	10^{-6} – 5×10^{-4}	5×10^{-7}	2.5	Dairy products and clinical analysis	[6]
CL FIA biosensor	10^{-6} – 10^{-3}	2×10^{-7}	1.3	Plasma and milk samples	[53]
Amperometric screen printed	7.5×10^{-5} – 10^{-3}	5×10^{-5}	7.5	Wine	[9]
Enzymatic O ₂ electrode	–	8.6×10^{-6}	5	Dairy products and serum samples	[54]
Amperometric FIA	10^{-5} – 1.8×10^{-3}	10^{-6}	10	Dairy products	[55]
CL FIA	10^{-7} – 10^{-3}	8×10^{-8}	0.24	Food and drinks	[15]
One-shot CL	5×10^{-5} – 4×10^{-3}	9.2×10^{-6}	5.5	Yoghurt	This paper

Table 3 – Determination of lactate in yoghurt by proposed and reference procedures

Yoghurt sample	CL biosensor (g L ⁻¹)	Reference (g L ⁻¹)	M.C.P.* (%)	P _{val} (%)
1	0.77 ± 0.05	0.79 ± 0.03	96.8	22.1
2	0.81 ± 0.05	0.82 ± 0.01	99.8	97.6
3	0.79 ± 0.04	0.78 ± 0.04	102.8	80.8

* M.C.P.: methods comparison percent.

3.7. Applications

The feasibility of the described biosensor was checked by analyzing lactate in different yoghurt samples. The coexisting substances in yoghurt checked as possible interferents were acetic acid, citric acid, ascorbic acid, uric acid and glucose. The concentrations of the different compounds in the diluted yogurt samples are roughly: glucose 5×10^{-5} M; ascorbic acid 2.5×10^{-6} M; uric acid 1.5×10^{-5} M with similar concentrations of the rest of the acids. None of them interfere with the CL response at 10^{-4} M of lactate. The selectivity of the enzymatic reaction along with the permselectivity of the polyion complex layer justifies these results.

The only treatment needed is dilution with Tris buffer obtaining a white solution, and filtration through a conventional Albet filter paper with a 20–25 µm pore size to separate the proteins. A small volume of this filtrate transparent solution, about 2 mL, is necessary to make the analysis. This simple treatment is possible considering the permselective characteristics of polyionic membrane used, with a cut-off around 10^3 D [33]. The data in Table 3 shows that the lactate content obtained using the proposed one-shot biosensor was in good statistical agreement with the data obtained with the manual enzymatic method (Boehringer-Mannheim kit) (including the dilution factor). The results obtained comparing both methods were between 95 and 105%.

4. Conclusions

A chemiluminescent one-shot biosensor has been developed using an enzymatic recognition system based on LOx and a transduction system based on luminol, ARP and metallic aluminum for lactate, immobilized in a plastic support by a polyion complex membrane prepared from PLL and PSS. This permselective membrane is suitable for the preparation of transparent disposable membranes for one-shot lactate biosensors with the characteristics of selectivity and quick

response. The one-shot biosensor described here makes it possible to monitor lactate in most practical situations. Examples include lactate control in yoghurt, with advantages in reducing contamination, cost reduction and reagent wastage, especially with luminol which is typically not immobilized in chemiluminescent sensors. It is environmentally friendly and has an estimated lifetime of at least 1 month when protected from light in normal conditions.

The drawbacks are related to precision, typically between 5 and 12% depending on the acquisition time used, but this could be improved with mass production techniques, which could also cut costs. The use of different mass production techniques and the development of small, hand-held and battery-operated instruments that will make decentralised analyses possible are now under investigation.

Acknowledgements

We acknowledge financial support from *Ministerio de Educación y Ciencia, Dirección General de Enseñanza Superior* (Spain) (Projects CTQ2005-09060-CO2-01, CTQ2005-09060-CO2-02 and P06-FQM-01467).

REFERENCES

- [1] J.B. Ewaschuk, G.A. Zello, J.M. Naylor, D.R. Brocks, J. Chromatogr. B 781 (2002) 39.
- [2] S. Benthin, J. Nielsen, J. Villadsen, Anal. Chim. Acta 247 (1991) 45.
- [3] D. Compagnone, D. Moscone, G. Palleschi, Recent Res. Dev. Pure Appl. Anal. Chem. 1 (1998) 73.
- [4] L.F. Capitán-Vallvey, in: C.A. Grimes, E.C. Dickey, M.V. Pishko (Eds.), Encyclopedia of Sensors, 1st ed., The Pennsylvania State University, 2005.
- [5] D.C. Klonoff, Diabetes Technol. Ther. 5 (2003) 929.
- [6] N.G. Patel, A. Erlenkotter, K. Cammann, G.C. Chemnitz, Sens. Actuators B 67 (2000) 134.

- [7] S.D. Sprules, J.P. Hart, R. Pittson, S.A. Wring, *Electroanalysis* 8 (1996) 539.
- [8] J.R. Braig, Diagnostic optical biosensor for combined enzyme-spectroscopic analysis of a biological fluid, PCT Int. Appl. 2006127724 (2006).
- [9] A. Avramescu, T. Noguer, M. Avramescu, J.L. Marty, *Anal. Chim. Acta* 458 (2002) 203.
- [10] J.M. Kauffmann, *Ann. Pharm. Fr.* 60 (2002) 28.
- [11] H.Y. Aboul-Enein, R.I. Stefan, J.F. Van Staden, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 29 (1999) 323.
- [12] C.A. Marquette, A. Degiuli, L.J. Blum, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 89 (2000) 107.
- [13] S. Girotti, S. Ghini, G. Carrea, R. Bovara, A. Roda, R. Budini, *Anal. Chim. Acta* 255 (1991) 259.
- [14] H. Nakamura, Y. Murakami, K. Yokoyama, E. Tamiya, I. Karube, M. Suda, S. Uchiyama, *Anal. Chem.* 73 (2001) 373.
- [15] A. Hemmi, K. Yagüda, N. Funazaki, S. Ito, Y. Asano, T. Imato, K. Hayashi, I. Karube, *Anal. Chim. Acta* 316 (1995) 323.
- [16] M.Y. Rubtsova, J.V. Samsonova, A.A. Ezhov, A.M. Egorov, *Biocatalysis-2000: Fundamental & Applications*, 2000. Vol. 41, No. 6. Supplement, pg 33. Moscow State University, Chemistry Department, ISSN: 05799384.
- [17] J. Samsonova, V.M.Y. Rubtsova, M. Franek, *Anal. Bioanal. Chem.* 375 (2003) 1017.
- [18] T.J.N. Carter, T.P. Whitehead, L.J. Kricka, *Talanta* 29 (1982) 529.
- [19] L.J. Kricka, X. Ji, *Anal. Sci.* 7 (1991) 1501.
- [20] A. Hasegawa, Chemiluminescent analytical test strip and holder, JP 08184595 (1994).
- [21] O.S. Khalil, T.F. Zurek, K.R. Genger, P.J. Curtis, Y.H. Jou, S.M. Cotter, Method and apparatus for heterogeneous chemiluminescence assay, US 5,089,424 (1992).
- [22] P.O. Vogelhut, Chemiluminescent analytical device, US 4,231,754 (1980).
- [23] S. Furuya, T. Imai, N. Hiratsuka, T. Ikeda, A. Kondo, Integral multilayered analysis elements and their use in body fluid analysis for clinical diagnosis, JP 62103542 (1986).
- [24] A. Tahirovic, A. Copra, E. Omanovic-Miklicanin, K. Kalcher, *Talanta* 72 (2007) 1378.
- [25] T.R. Kissel, A.E. Friedman, S.A. Fingar, Chemiluminescent reagent and assay using a substituted acetanilide for light generation, US 5,705,357 (1998).
- [26] H. Akhavan-Tafti, K. Sugioka, Y. Sugioka, L.V. Reddy, Chemiluminescent detection methods using dual enzyme-labeled binding partners, US 5,843,666 (1998).
- [27] R.T. Belly, M.M. Kopcienski, C. Erdrich, M.A. Kildal, Format for immunoassay in thin film, US 5,958,339 (1999).
- [28] M.Y. Rubtsova, G.V. Kovba, A.M. Egorov, *Biosens. Bioelectron.* 13 (1998) 75.
- [29] L.A. Liotta, B.C. Christiansen, A.R. Day, T. Harlacher, K. Paweletz, Light-emitting immunoassay, US 5,942,407 (1997).
- [30] J. Ballesta Claver, M.C. Valencia Miron, L.F. Capitán-Vallvey, *Anal. Chim. Acta* 522 (2004) 267.
- [31] K. Seiler, W. Simon, *Anal. Chim. Acta* 266 (1992) 73.
- [32] Boehringer Mannheim. Boehringer Mannheim L-lactate kit, 2006.
- [33] F. Mizutani, S. Yabuki, Y. Hirata, *Anal. Chim. Acta* 314 (1995) 233.
- [34] A. Berger, L.J. Blum, *Enzyme Microb. Technol.* 16 (1994) 979.
- [35] T. Nakayama, T. Amachi, *J. Mol. Catal. B: Enzyme* 6 (1999) 185.
- [36] M. Tanaka, K. Ishimori, I. Morishima, *Biochemistry* 38 (1999) 10463.
- [37] B.B. Kim, V.V. Pisarev, A.M. Egorov, *Anal. Biochem.* 199 (1991) 1.
- [38] J. Gu, P. Xu, Y. Qu, *J. Mol. Catal. B: Enzyme* 18 (2002) 299.
- [39] P.B. Martelli, B.F. Reis, A.N. Araujo, M. Conceicao, B.S.M. Montenegro, *Talanta* 54 (2001) 879.
- [40] E. Lissi, C. Pascual, M.D. Del Castillo, *Free Radic. Biol. Med.* 16 (1994) 833.
- [41] Y. Huang, W. Liu, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 38 (2005) 537.
- [42] H.P. Misra, P.M. Squatrito, *Arch. Biochem. Biophys.* 215 (1982) 59.
- [43] S. Kulmala, C. Matachescu, A. Kulmala, D. Papkovsky, M. Hakansson, H. Ketamo, P. Canty, *Anal. Chim. Acta* 453 (2002) 253.
- [44] J. Kulyš, K. Krikstopaitis, S. Ebdrup, A.H. Pedersen, P. Schneider, *J. Mol. Catal. B: Enzyme* 2 (1996) 93.
- [45] I.Yu. Sakharov, *Biochemistry* 66 (2008) 515.
- [46] C. Pascual, M.D. Del Castillo, C. Romay, *Anal. Lett.* 25 (1992) 837.
- [47] M. Nakamura, S. Nakamura, *Free Radic. Biol. Med.* 24 (1998) 537.
- [48] M.J.R. Previte, C.D. Geddes, *J. Fluor.* 17 (2007) 279.
- [49] A. Roda, S. Girotti, B. Grigolo, S. Ghini, G. Carrea, R. Bovara, I. Zini, R. Grimaldi, *Biosens. Bioelectron.* 6 (1991) 21.
- [50] R.W. Min, J. Nielsen, J. Villadsen, *Anal. Chim. Acta* 312 (1995) 149.
- [51] L.J. Blum, S.M. Gautier, A. Berger, P.E. Michel, P.R. Coulet, *Sens. Actuators B* 29 (1995) 1.
- [52] N.J. Miller, J.C. Miller, *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*, 4th ed., Prentice Hall, Madrid, 2002.
- [53] F. Wu, Y. Huang, C. Huang, *Biosens. Bioelectron.* 21 (2005) 518.
- [54] M.M.F. Choi, *Food Chem.* 92 (2005) 575.
- [55] F. Ghamouss, S. Ledru, N. Ruille, F. Lantier, M. Boujtita, *Anal. Chim. Acta* 570 (2006) 158.

Disposable electrochemiluminescent biosensor for lactate determination in saliva

J. Ballesta Claver^a, M.C. Valencia Mirón^a, and L.F. Capitán-Vallvey^{a,b}

Received (in XXX, XXX) Xth XXXXXXXXX 200X, Accepted Xth XXXXXXXXX 200X

First published on the web Xth XXXXXXXXX 200X

DOI: 10.1039/b000000x

An electrochemiluminescence-based disposable biosensor for lactate is characterized. The lactate recognition system is based on lactate oxidase (LOx) and the transduction system consists of luminol, both immobilized in a Methocel membrane. The measurement of the electrochemiluminescence (ECL) is made possible via a photocounting head when 50 μl of sample is placed into screen printed electrochemical cells with a circular cell containing the disposable sensing membrane on the working electrode. The composition of the membrane and reaction conditions have been optimized to obtain adequate sensitivity. The disposable biosensor responds to lactate after 20 s when two 1 s pulses at 0.5 V are applied to obtain the analytical parameter, the ECL initial rate. The linearized double logarithmic dependence for lactate shows a dynamic range from 10^{-5} to $5 \cdot 10^{-4}$ M with a detection limit of $5 \cdot 10^{-6}$ M and a sensor-to-sensor repeatability, as relative standard deviation, RSD, of 3.30 % at the medium level of the range.

The ECL disposable biosensor was applied to the analysis of lactate in human saliva as an alternative procedure for obtaining the lactate level in a non-invasive way. Interferences coming from components of saliva were studied and eliminated in a simple way that was easy to handle. The procedure was validated for use in human saliva, comparing the results against an enzymatic reference procedure. The proposed method is quick, inexpensive, selective and sensitive and uses conventional ECL instrumentation.

^a Solid Phase Spectrometry Research Group, Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, Campus Fuentenueva, University of Granada, Granada, E-18071, Spain.

^b Corresponding author. E-mail address: lcapitan@ugr.es (L.F. Capitán-Vallvey).

1. Introduction

The development of non-invasive procedures for the measurement of metabolites in matrices other than blood is very interesting, particularly for people who need to frequently control parameters such as glycemia and lactate, and for those who have problems with blood extraction¹.

Lactic acid appears when the aerobic metabolism of glucose to produce energy, such as ATP molecules, switches to anaerobic metabolism. When lactic acid lowers the blood pH, it can damage muscles, and thus the lactate level needs to be monitored in critical-care patients, primarily to prevent heart attacks. Lactate analysis is also used in diabetes control, food analysis and sports medicine to help athletes tailor their training. The determination of lactate is generally carried out by invasive techniques using blood as the sample. Of the different sampling sites and matrices for non-invasive sensing, saliva is especially interesting for non-invasive lactate analysis due to its high correlation to blood lactate; typically a 1:4 saliva/blood ratio², with the lactic acid level in human saliva being around $2 \cdot 10^{-4}$ M¹.

The evaluation of blood lactate levels can be performed using different types of monitors, from portable handheld to small benchtop or freestanding monitors³ using a variety of methods, including enzymatic and biosensor methods based on lactate oxidase and/or lactate dehydrogenase immobilization and electrochemical and spectrophotometric techniques^{4,5}.

Sensors for lactate have been developed over the last two decades, mostly amperometric ones, based on the change in concentration of a redox-active reactant or product via an analyte specific enzyme reaction. Different enzyme biosensors for lactate have been described, mainly, cytochrome b2, lactate monooxygenase and lactate oxidase immobilized on different types of polymers⁶, conducting polymers⁷ or nanomaterials⁸. Different types of screen printed amperometric disposable sensors have been described for lactate and some of them are on the market, especially the fitness market⁹.

Chemiluminescence (CL), recognized as a useful and versatile technique with low detection limits, has been used for sensing lactate based on enzymatic systems, chiefly lactate oxidase/peroxidase/luminol¹⁰ and lactate dehydrogenase/NADH/ bioluminescent enzymes¹¹ implemented in different types of flow^{12,13} or fiber optic formats¹⁰. Nevertheless, chemiluminescent detection has rarely been used in disposable sensors despite its advantages of sensitivity and simple instrumentation, because of the need to immobilize all the chemistries required and the time control to trigger the sensing reactions upon contact with the sample.

Different types of enzymatic or immunological sensors in disposable format based on chemiluminescence measurement using a luminometer¹⁴, portable scanning luminometer¹⁵ or different types of photographic films¹⁶ have been proposed for organic and inorganic analytes¹⁷.

Electrochemiluminescence (ECL), the luminescence produced by the relaxation of excited molecules coming from an electrochemically initiated reaction, is a very convenient technique that combines the sensitivity of light-emitting reactions with easy control of the reaction. In this way, ECL has been used for detection in chromatographic systems and electrophoresis and in sensors, mainly in flow and fiber optic format¹⁸ but rarely in disposable format. Blum *et al.* have described^{19,20} a screen printed multiparametric biosensor, including lactate, based on ECL detection of enzymatically produced hydrogen peroxide that is a interesting approximation to disposable devices. The immobilization of peroxidases in a photopolymer that includes a dispersed anion exchanger containing luminol makes it possible to capture spatially defined ECL signals using a CCD camera.

The aim of this study was to develop a disposable electrochemiluminescent biosensor for lactate based on the generation of hydrogen peroxide by lactate oxidase and the subsequent reaction with electrochemically oxidized luminol, based on commercial screen printed electrochemical cells with reagents immobilized in a Methocel membrane on the graphite working electrode and conventional PMT detectors. Additionally, we are interested in its application to the determination of lactate in saliva as a very convenient matrix for non-invasive monitoring of this metabolite.

2. Experimental

2.1. Chemicals

L-(+)-Lactate 10^{-2} mol·l⁻¹ stock solutions in pH 9.0 phosphate buffer 0.2 M were prepared using L-(+)-Lactate lithium salt 97% from Sigma (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, Spain). Solutions of lower concentrations were prepared by dilution. Buffers, made with Tris 0.5 M (Trizma base 99%) and

phosphate 0.5 M (Na_2HPO_4) and adjusted to different pH by adding NaOH or HCl, were prepared. Other chemicals were NaCl, CaCl_2 , KCl, KSCN, NH_4Cl , citric acid, uric, ascorbic acid and sodium carboxymethyl cellulose (CMC). All of these compounds were supplied by Sigma.

The ECL reaction was carried out by the following reagents: 10^{-2} M luminol (5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione) stock solution from 97 % luminol, lactate oxidase (LOx) from *Pediococcus species*, 39 IU·mg⁻¹ and 96 % albumin from bovine serum (BSA) powder, all supplied by Sigma. To make the membrane, we used polyvinyl chloride, glutaraldehyde solution (grade I, 25% w/v in water), cellulose triacetate (CTA), poly-L-lysine hydrobromide (MW 84,000 g·mol⁻¹) and poly (sodium 4-styrenesulfonate) (MW 70,000 g·mol⁻¹) 30 wt % solution in water, all supplied by Sigma and Methocel[®] 90HG (hydroxypropylmethyl cellulose) purchased from Fluka. Additional chemicals were the solvent tetrahydrofuran (THF); the plasticizer o-nitrophenyl octyl ether (NPOE), and the quaternary ammonium salt Aliquat 336, all supplied by Sigma. All chemicals used were of analytical-reagent grade. Reverse-osmosis type quality water (Milli-Q Plus185 from Millipore, Molsheim, France) was used throughout.

2.2. Enzyme preparation

The LOx solution was prepared by placing 1.40 mg into a 1 ml of pH 7.0 phosphate buffer 0.1 M and conserved in Eppendorf tubes (60 μl) at -20°C .

2.3. Artificial saliva preparation

An artificial saliva was prepared containing 5 mM of NaCl, 1 mM of CaCl_2 , 15 mM of KCl, 1 mM of citric acid, 5 mM of uric acid, 1 mM of ascorbic acid, 0.2 mM of lactate, 1.1 mM of KSCN, 4 mM of NH_4Cl and 10 g·l⁻¹ of sodium carboxymethyl cellulose (CMC) in water^{21,22}.

2.4. Apparatus and software

ECL emission was measured using a H8529 photomultiplier (PMT) interfaced by a C8855 USB photo counting unit, both from Hamamatsu Technologies, connected to a personal computer. The potentiostat used was a PS-PC1 model Palmsens from Ivium Technologies (Eindhoven, Netherlands) with a connector for screen printed electrodes.

We designed a two-piece holder made of black polystyrene, one piece to hold the PMT and another where the screen printed electrodes are placed as close as possible to the PMT. The holder was placed in a customized black box with vents for wire connections to the potentiostat and computer (Figure 1).

Figure 1

Other apparatus and laboratory materials consisted of a Crison digital pH-meter (Crison Instruments, Barcelona, Spain) with combined glass-saturated calomel electrode, and a customized controlled temperature chamber (-20°C to 80°C). Software programs used were: CSW32 software package from DataApex Ltd. ver. 1.2.5 (2001) (Prague, Czech Republic) for the acquisition and manipulation of luminescence records; Hamamatsu Labview program (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan) for the acquisition of luminescence signals; Palmsens-PC program for potentiostat control (Palmsens Instruments BV, Netherlands) and a Statgraphics software package (Manugistics Inc. and Statistical Graphics Corporation, USA), ver. 5.0 (2000) for data treatment.

2.5. Screen printed electrochemical cells

Screen printed electrochemical cells were provided by PalmSens Instruments BV and consist of a round-shaped graphite working electrode, a graphite counter electrode and a silver pseudo-reference electrode on a 10 mm x 40 mm x 0.5 mm plastic support. Before being used, the electrochemical cells were tested for uniform behavior. In order to prepare a receptacle on the disposable electrochemical cell we covered the electrode area with successive layers of plastic white adhesive tape up to 1 mm thick with an 8 mm diameter hole (50 μ l volume) in the sensing area (see Figure 1).

2.6. Disposable biosensor preparation

The lactate sensitive membranes were made using a cocktail prepared in a 3 ml glass vial with 0.51 mg of luminol, 2.5 mg of BSA, 12.5 mg of Methocel, 50 μ l of 12.5 IU·ml⁻¹ LOx and 200 μ l of pH 8.5 phosphate buffer. The cocktail was shaken and ultrasonicated for 10 min and then stored in a refrigerator at 4 °C.

The disposable biosensors were cast by placing 5 μ l of the prepared cocktail on the working electrode of the electrochemical cell. After this, the biosensors were dried at room temperature for 1 h and then stored in a refrigerator at 4 °C until use.

2.7. Procedures

2.7.1. Standards. Aqueous standard solutions of lactate containing between 10⁻⁵ and 5·10⁻⁴ M in working buffer, consisting of pH 9.0 phosphate buffer 0.2 M containing 0.25 M of NaCl, were prepared. 50 μ l of standard or sample solution were taken and deposited in the receptacle of the screen printed cell. The lactate sensitive biosensor was placed in the holder previously described and covered with the lid that held the PMT. Then, two pulses of 1 s with 10 s of difference between them at 0.5 V were applied measuring the ECL emission in the PMT without wavelength discrimination.

2.7.2. Saliva. 50 μ l of prepared saliva (see Treatment of saliva samples) was placed in the receptacle of the cell and 0.4 V was applied for 4 s. 6 s later, two pulses of 1 s with 10 s of difference between them at 0.5 V were performed measuring the ECL signal as indicated above. For the determination of lactate in saliva, it was necessary to process an internal blank²³ for every sample. This blank consisted of a measurement using the same protocol with the biosensors prepared without enzyme.

2.7.3. Reference. As reference procedure, we used the enzymatic bioanalysis Boehringer Mannheim UV-Kit method from r-Biopharm AG (ATOM S.A., Barcelona, Spain)²⁴. It was necessary to introduce a centrifugation (10 minutes at 1,000 rpm) and a filtration step (0.40 μ m cellulose acetate filter) for the determination of L-lactate in saliva because the kit only indicates general directions for organic samples.

2.8. Treatment of saliva samples

Saliva samples coming from healthy volunteers who brushed their teeth and rinsed their mouths to minimize the influence of oral microbiological flora and nutrition were collected²⁵. These samples were frozen after collection (-20 °C) to arrest the bacterial metabolism¹. For the analysis of lactate in human saliva, typically 500 μ l of supernatant liquid, after thawing the sample, was mixed with 2.0 ml of working buffer. Then, the solution was filtered through a 0.4 μ m cellulose acetate filter and used for the test. In the

case of the reference procedure, centrifugation was needed, after thawing, using the same sample preparation but using water to dilute the sample.

3. Results and discussion

3.1. Reagent immobilizations for ECL lactate sensing.

In this study, we are interested in the preparation of a disposable electrochemiluminescent biosensor for lactate based on the atmospheric oxidation of lactate catalyzed by LOx producing hydrogen peroxide that reacts with electrochemically oxidized luminol in a basic medium, generating ECL emission. For this, we needed to immobilize all of the reagents needed to make the lactate recognition and transduction possible. To immobilize the reagents, LOx and luminol, we tried different methods. For LOx we used entrapment with Methocel²⁶, ion-exchange with a polyion complex layer made with poly-L-lysine and polystyrenesulfonate²⁷, encapsulation with cellulose triacetate (CTA) and cross-linking with glutaraldehyde, both in solution or vapor combined to BSA^{28,29}. The luminol immobilization was studied by entrapment with Methocel, Nafion or PVC with NPOE as plasticizer and Aliquat 336 as ion-pair formation agent, and encapsulation with CTA.

Using the above immobilization systems, we studied two membrane arrangements: monolayer and bilayer, the latter to overcome compatibility problems between the reagents. Of the different bilayer configurations tested, only two arrangements offered some results: a) a Nafion upper layer containing luminol and a lower layer with LOx cross-linked with glutaraldehyde (relative ECL signal 0.5 %); and b) a polyion complex membrane with LOx in the upper layer and a PVC lower layer with luminol (0.8 %). Only three different types of monolayers work with lactate: a) PVC based membrane (0.4 %); b) CTA membrane (1.3 %); and c) Methocel membrane (100 %).

Immobilization by cross-linking with glutaraldehyde cannot be used for luminol inclusion due to a Schiff base formation that hinders the luminol oxidation and consequent ECL emission³⁰. Membranes containing hydrophobic polymers such as PVC or CTA give poor results due to low enzymatic activity and low lactate uptake. The polyion complex membrane could be used for this immobilization¹⁴ but we obtained low adherence on the graphite working electrode and brittle membranes. Methocel based membranes offered the best results considering adherence, good electrical properties and their hydrophilic character. Their reuse is limited but this is not a problem if the biosensors are used in disposable format. Consequently, we selected Methocel as the entrapment polymer for the preparation of the monolayer ECL biosensor.

3.2. Optimization of lactate biosensor composition

Once the membrane material had been selected, we studied different factors related to making the membrane, including the concentration of chemicals and membrane polymers. All these factors were studied univariantly.

3.2.1. Layer composition

Methocel. To optimize the Methocel concentration, we prepared membranes using polymer concentrations ranging from 8.32 to 83.2 mg·ml⁻¹. The ECL signal increases as the Methocel

concentration goes up to $49.9 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, reaching a plateau at higher concentrations (Figure 2A). This is due to the fact that Methocel, an aqueous hydroxypropylmethyl cellulose polymer, contributes to the enhancement of the electric properties of the membrane^{26,31}.

Cocktail pH. An important factor to consider for membrane preparation is the cocktail pH. The pH of maximum enzymatic activity of LOx is 7.5³², but since luminol needs a basic media for solution and for ECL emission, an 8.5 pH buffer was selected³³ as a compromise for optimum enzymatic activity and stability³⁴. The optimization of the working pH is studied in Section 3.4 below.

LOx enzyme. To optimize the concentration of the enzyme, we prepared disposable biosensors modifying the LOx concentration between 3.1 and $40.0 \text{ IU}\cdot\text{ml}^{-1}$ obtaining a maximum at $12.5 \text{ IU}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Figure 2B), then decreasing due to an excess of enzyme concentration with respect to the substrate. The optimum enzymatic charge in the membrane corresponds to 0.062 IU LOx .

BSA protein. The usual limited stability of enzymes in the membranes can be overcome using proteins, like BSA, as stabilizers^{35,36}. To study BSA influence, different cocktails with BSA concentrations from 25 to $250 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ were prepared and the corresponding biosensors showed a maximum ECL signal against lactate at $100 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ BSA (Figure 2C). It has been suggested that basic groups carrying lone pair electrons from BSA interact with protons of the amino and hydrazide groups of luminol³⁷ stimulating the intramolecular chemically initiated electron-exchange luminescence (CIEEL) mechanism of luminol³⁸ and contributing to increase the signal. A further increase of BSA in the membrane decreases the ECL signal. Consequently, a concentration of $100 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ BSA was chosen to make the membrane, which means 90 times of BSA in mass with respect to LOx in membrane, as is usual with BSA-enzyme immobilization³⁹.

Figure 2

Luminol. The ECL signal increases with the luminol concentration in the membrane (Figure 2D) up to $2.9\cdot 10^{-3} \text{ M}$, then decreasing slightly. This fact has been described for luminol in solution^{40,41} and justified by Misra *et al*⁴² as due to the accumulation of products or the dismutation of reactive intermediates rather than the depletion of reagents.

3.2.2. Cocktail volume. The influence of the cocktail volume used in making the membrane was studied preparing biosensors with cocktail volumes from 5 to $25 \mu\text{l}$ on the working electrode. The results showed a progressive decrease in the ECL relative signal reaching around 84% when the volume increased to $25 \mu\text{l}$. Thus, $5 \mu\text{l}$ was chosen as the optimal value. The reason for this behavior could be related to the increase in the thickness of the membrane which reduces the uptake of lactate. Higher volumes spread the cocktail over all three electrodes, drastically reducing the ECL emission.

3.3. Electrochemiluminescent conditions

3.3.1. Voltage selection. Luminol is electrochemically oxidized and produces light emission in basic solutions at positive potentials when oxygen or hydrogen peroxide is in the medium. In this case, the cyclic voltammetry of luminol immobilized in Methocel on the working electrode shows an electro-oxidation signal at 0.6 V (Figure 3B). However, working in chronoamperometric mode, the ECL signal starts at a fixed potential of 0.3 V ⁴³ and the intensity increases steeply as the potential increases, up to 0.5 V and continuing in this way (Figure 3A). One advantage of the use of graphite electrodes is that the

oxidation potential of hydrogen peroxide is more positive (typically 1.12 V at pH 7.4) than that of luminol, unlike what occurs with other electrodes like platinum⁴⁴.

Figure 3

3.3.2. ECL signal. ECL is conventionally initiated using different transient-state electrochemical techniques such as cyclic voltammetry, normal pulse voltammetry, differential pulse voltammetry and chronoamperometry⁴⁵. In this case, since the ECL signal varies with time due to enzymatically catalyzed hydrogen peroxide generation, is important to know the emission pattern with time to select the measurement conditions. For a constant amount of lactate, the ECL signal coming from successive pulses at the same voltage grows with time, reaching a plateau due to the enzymatic kinetic and luminol consumption (Figure 5A).

We studied different possible analytical parameters working in chronoamperometric mode: a) ECL intensity using a short pulse (< 5 s); b) ECL emission integration, using a long time pulse (≥ 1 min); c) initial rate estimation. Comparing precision and linearity range (lack of fit test), the third parameter offered the best results.

The initial rate for different lactate concentrations, which obey a Michaelis-Menten kinetic, can be estimated more easily using a two point simplification, as shown in Figure 5A. In this way, it is not necessary to obtain the initial reaction rate from the ECL profiles measured using equal consecutive pulses, but using intensities at two pulses $\left(v_{\text{ECL}} = \frac{\Delta I_{\text{ECL}}}{\Delta t}\right)$, in $\text{V}\cdot\text{s}^{-1}$ units. Since a background ECL emission exists, the analytical signal v_{ECL} was corrected for the blank as $v_{\text{standard}} - v_{\text{blank}}$.

3.3.3. Electrochemical parameters. The electrochemical parameters studied were: a) duration of the pulse; and b) time interval between consecutive pulses. In the first case, we studied three different pulse durations (1, 2 and 3 s) observing that when the time of pulse increases, the analytical signal v_{ECL} decreases (some 76.4 % from 1 to 3 s). This is due to fact that the longer the time pulse, the higher the consumption of generated hydrogen peroxide is and the higher the ECL emission is, but the difference in intensity with the next pulse is lower. For that reason, we used 1 s as the optimum time for the pulse. b) Different time intervals between consecutive pulses for ECL acquisition were studied (10, 30, 50 s). The results obtained (100 % for 10 s; 83.1 % for 30 s and 42.1 % for 50 s) show that 10 s gives the best signal due to the higher luminol absorption on the working electrode when the pulses are nearest⁴⁶.

3.4. Optimization of experimental conditions.

3.4.1. pH influence. The pH influence was studied between 7.0 and 11.0, working at a constant lactate concentration (10^{-4} M). Figure 4A shows two different ECL emissions maxima, at pH 8.5 and 10.5, a behavior similar to that observed by Chen *et al.*⁴⁶, but if the signal-to-noise ratio (S/N) is represented, only one maximum appears at pH 9.0 (Figure 4B). If the pH is greater than 9.0, the S/N decreases because the blank signal and the standard deviation grow strongly with pH. For this reason, we selected pH 9.0 as the working pH. The first ECL maximum at 8.5 is due to the compromise between the enzymatic activity of LOx (maximum at 7.5) and the reactivity of luminol which increases with pH⁴⁷. The dramatic subsequent increase in ECL intensity when the pH rises to 10.5 is due to the increase in the

concentration of the basic peroxide intermediate of luminol. The decrease in ECL emission at a pH higher than 10.5 is justified by the strong decrease in quantum yield of 3-aminophthalate at a pH above 11.0⁴⁸.

Figure 4

3.4.2. Buffer and electrolyte contribution. pH 9.0 phosphate and Tris were studied as buffer solutions, observing that a Tris buffer means a decrease of around 30 % in the ECL signal with respect to the phosphate buffer. The dependence of the selected phosphate buffer concentration was studied between 0.05 to 0.8 M, showing a maximum at 0.2 M and a gradual decrease at higher buffer concentrations. This behavior could be due to an osmotic pressure effect that lowers the lactate entrance in the membrane, decreasing the ECL emission. Additionally, the presence of an electrolyte is necessary to increase the conductivity of the membrane and the peak resolution⁴⁹. Different concentrations of NaCl from 0.12 to 2.0 M were prepared, obtaining a maximum at 0.25 M.

3.4.3. Volume of sample. The sample volume placed in the receptacle of the biosensor was studied, showing that the ECL signal grows when the volume increases. An increase from 10 to 50 μl means an increase of 71.9 % in the ECL, because an increased volume contributes to the PMT becoming closer to the emitter surface of the biosensor. Higher volumes (60 μl) cause the signal to decrease, probably due to the dispersion caused by the lens shape of the deposited drop. We selected 50 μl , the maximum capacity of the receptacle prepared on the biosensor, as the sample volume.

3.4.4. Temperature. This parameter affects both enzymatic reaction³² and luminol reaction⁵⁰, being more pronounced for the first. The ECL signal of this biosensor increases with temperature an average of 2.6 $\text{V}\cdot\text{s}^{-1}$ per Celsius degree. The selected working temperature was room temperature (20-25 $^{\circ}\text{C}$) because of the easier conditions for routine analysis and sufficient sensitivity for lactate determination.

3.5. ECL mechanism

In alkaline medium, luminol forms an anion that is electrochemically oxidized to a diazaquinone at 0.5 V on the screen printed graphite electrode. The hydrogen peroxide produced by atmospheric lactate oxidation catalyzed by LOx reacts with this diazaquinone giving rise to excited 3-aminophthalate, whose deactivation causes luminescent emission^{19;51}. If the medium is more alkaline, a higher emission is obtained, due to an increase in luminol deprotonation^{44;52}, as shown in Figure 4A. The role of hydrogen peroxide is to participate as a peroxide anion HOO^- in the reaction with the electrochemically oxidized luminol; additionally, oxidized luminol can react with oxygen, forming superoxide radical $\text{O}_2^{\cdot-}$ that emits light in the presence of more oxidized luminol⁵³. In the absence of lactate, a background ECL signal is observed that starts to grow from pH 9.0 up to 10.5 (the background ECL signal increases 206.3 $\text{V}\cdot\text{s}^{-1}$ per pH unit). This background signal is due to the reaction of the dissolved oxygen present in the solution with the oxidized luminol and also to the more efficient production of excited 3-aminophthalate with pH⁴⁷. Thus, the quantification of lactate must be performed in weakly alkaline conditions because the increases in the background produce lower precision; namely, from 4.5 % of relative standard deviation (RSD) at pH 9.0 to 34.8 % at pH 10.5.

3.6. Analytical Parameters

The analytical function was obtained by means of a calibration set composed of 5 standards with 5 replicates each between 10^{-5} and $4 \cdot 10^{-3}$ M and pH 9.0. The logarithmic behavior was linearized using a double logarithmic curve: $\log v_{\text{ECL}} = a \cdot \log [\text{lactate}] + b$ (Figure 5B). This analytical function is commonly used with ECL enzymatic biosensors¹⁹.

Figure 5

Table 1

Since the calibration function is logarithmic, the limit of the detection LOD is obtained using the standard criteria⁵⁴: $\text{LOD} = y_b + 3s_b$, where y_b is the average blank signal and s_b is the standard deviation of the blank, which is determined from ten blanks from different biosensors (RSD 5.13%). The LOD found using these criteria is $5 \cdot 10^{-6}$ M.

The repeatability, expressed as RSD of lactate concentration, was studied in two ways: a) using a set of 10 different screen printed biosensors working at three lactate concentrations between the analytical range (RSD 3-5 %); and b) using the same screen printed cell 10 times prepared anew after each measurement and working at 10^{-4} M lactate concentration (RSD 3.68 %) (Table 1). Thus, the use of different biosensors produces a precision quite similar to that obtained using the same screen printed cell.

The lifetime of the disposable biosensor was studied protected from light and preserved at 4 °C using a series of prepared biosensors and regularly checking their response to a lactate concentration of 10^{-4} M. The signal grows up to 5 days after the biosensors are prepared, as can be observed in the Shewhart diagram (Figure 6). The lifetime obtained is around 2 months, which is acceptable for this type of biosensor and coincides with the long-term stability study of an amperometric lactate biosensor based on LOx by Mizutani *et al.*²⁷. The cost of the biosensor considering reagents, screen printed cells and support for membrane making is around 1.06 €/unit.

A comparative study of different sensors is presented in Table 2, showing that the disposable biosensor described has a good precision, although a shorter lineal range when compared to other sensors.

Figure 6

Table 2

3.7. Applications

The feasibility of the described biosensor was checked by analyzing lactate in human saliva. Saliva is a complex mixture of parotid, submandibular, sublingual, and minor gland secretions, mixed bacteria, sloughed epithelial cells, crevicular fluid, inorganic and organic compounds as lactic acid¹. First, we tested the potential interference of whole saliva in lactate analysis by measuring a 10^{-4} M lactate solution in the presence of saliva. We observed a decrease in the ECL signal, although this decrease depended on the dilution of the saliva (55.4 % to 1:2 dilution, 27.3 % to 1:4, 25.7 % to 1:8, and 18.8 % to 1:12), which suggests a matrix effect that could be reduced with dilution. Additionally, calibration curves in the presence (standard addition) and absence of saliva showed different slopes (a difference of 59.8 %), confirming the matrix effect.

To overcome the matrix effect, we studied the different alternatives indicated below. We always used saliva coming from a healthy subject in fasting conditions whose teeth were brushed and mouth rinsed 30 min before sampling²⁵.

In the first instance, we studied some procedures to eliminate proteins, epithelial cells and biomolecules and/or extract lactate. To do this, we compared the ECL signal of saliva with 10^{-4} M added lactate with the ECL signal of a standard lactate 10^{-4} M. Saliva was diluted 1:4 with working buffer in all cases. Centrifugation is a common method because it stops the bacterial action and removes both the cells and the turbidity¹ but in this case it produced a diminution in the ECL signal of 14.3 %. Other methods were used obtaining the following decrease in percentages: heating in water bath (51.3%); extraction with ethyl ether and hexane (10.2 % for ethyl ether and 55.8 % for hexane); C_{18} solid phase extraction (32.4 %) and filtration through syringe filters (0.25 μm : 25.7 % and 0.40 μm : 12.6 %). As can be seen, none of these procedures produce a partial effective elimination of interferences^{55,56}.

Table 3

To study possible interferences, we prepared artificial saliva²¹ checking that the interference in lactate determination was similar to that of human saliva. Then we studied the interference of the different artificial saliva components (Table 3), with uric acid and ascorbic acid being the main interferences. Both acids are the most common interferences in amperometric biosensors for lactate⁵⁷. The usual concentration of these acids in saliva is $5 \cdot 10^{-3}$ M for uric acid and 10^{-3} M for ascorbic acid and their oxidation potential in the electrochemical cells in our working conditions was 0.62 V and 0.11 V, respectively (Figure 7A), values similar to those reported by John⁵⁸.

Ascorbic acid interferes by reducing the H_2O_2 generated from lactate. As a possible way to eliminate this interference, we tried prior oxidation on the screen printed graphite electrode, a procedure described for the amperometric determination of uric acid in the presence of ascorbic acid^{59,60}. We observed that by applying 0.4 V for 4 s before ECL measurement, ascorbic acid is oxidised and its interference disappears at its usual concentration in saliva. Additionally, if we compared the double logarithmic calibration function for lactate both with and without a constant amount of saliva, applying the previous 0.4 V only for the saliva sample, we observed parallel linear functions (slopes with a similarity of 96.9 %); i.e., there is still another interference, due to uric acid, but there is no matrix effect (Figure 7B). Uric acid is electrochemically oxidized⁶¹ at the same time as luminol and this effect interferes with the measurement. To estimate the uric acid effect, different concentrations of uric acid were added to saliva samples, showing a decrease in the ECL signal when the uric acid increases. From the inspection of lactate calibration functions with different added uric acid concentrations ($\log v_{\text{ECL}} = 0.94 \cdot \log[\text{lactate}] + 5.89$ for no addition ; $\log v_{\text{ECL}} = 0.89 \cdot \log[\text{lactate}] + 4.64$ for $2 \cdot 10^{-4}$ M; $\log v_{\text{ECL}} = 0.92 \cdot \log[\text{lactate}] + 3.62$ for $5 \cdot 10^{-3}$ M) (Figure 7B) we concluded that uric acid only affects the ordinate of the calibration and does not contribute to the matrix effect.

Figure 7

To correct the error from the presence of uric acid, we used the internal blank procedure²³ for every saliva sample. This blank (v_{blank}) was obtained by means of a similar biosensor without enzyme.

In brief, it is possible to analyze saliva for lactate by means of the proposed ECL biosensor using a 1:4 dilution with working buffer, filtration through a 0.40 μm cellulose filter, followed by pre-treatment on the same biosensor applying 0.4 V for 4 s and finally a blank correction of saliva.

To verify the reliability of the proposed procedure, we analyzed saliva from three different people, validating the results against a manual enzymatic spectrophotometric method (Boehringer-Mannheim kit) used as a reference procedure (Table 4).

Table 4

4. Conclusions

An electrochemiluminescent disposable biosensor for lactate in saliva has been developed using an enzymatic recognition system based on lactate oxidase and a transduction system based on luminol. We succeeded in preparing and optimizing a very simple disposable optical sensor through the immobilization of all the reagents needed in a Methocel cellulose membrane on commercial screen printed graphite electrochemical cells. This is environmentally friendly and has an estimated lifetime of at least two months when protected from light in normal conditions. Good repeatability, quick measurement (20 s) and versatility makes it possible to use the sensor to monitor lactate in saliva samples as routine analysis with a sample treatment compatible with a disposable format. To the best of our knowledge, this is the first ECL biosensor used to monitor lactate in saliva and, thus, could be considered as a non-invasive analysis alternative to the usual ways of determining blood lactate. Currently, we are working on designing and tuning optical portable instrumentation for biosensors based on screen printed electrodes using ECL as an analytical technique.

Acknowledgements

We acknowledge financial support from *Ministerio de Educación y Ciencia, Dirección General de Enseñanza Superior* (Spain) (Projects CTQ2005-09060-CO2-01, CTQ2005-09060-CO2-02 and P06-FQM-01467).

References

1. G.G. Guilbault, G. Palleschi and G. Lubrano, *Biosensors Bioelectron.* 1995, 10, 379-392.
2. R.V.T. Santos, A.L.R. Almeida, E.C. Caperuto, J. Martins and L.F.B.P. Costa Rosa, *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 2006, 145, 114-117.
3. D.C. Klonoff, *Diabetes Tech. Therapeut.* 2003, 5, 929-931.
4. B. Detry, W. Nullens, M.L. Cao, A. Frans, A. Robert and T. Clerbaux, *Eur. Resp. J.* 1998, 11, 183-187.
5. Suman, A. Kumar, *Sens. Trans. J.* 2008, 96, 18-31.
6. K. Yoda, K. Shimazaki and Y. Ueda, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1998, 864, 600-604.
7. M. Gerard, A. Chaubey and B.D. Malhotra, *Biosensors Bioelectron.* 2002, 17, 345-359.
8. X. Cui, C.M. Li, J. Zang and S. Yu, *Biosensors Bioelectron.* 2007, 22, 3288-3292.
9. Medizin, Overview: Lactate Analysers, <http://medizin.li/lactate/>, 2008.
10. C.A. Marquette, A. Degiuli and L.J. Blum, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2000, 89, 107-115.

11. S. Girotti, S. Ghini, G. Carrea, R. Bovara, A. Roda and R. Budini, *Anal.Chim.Acta* 1991, 255, 259-268.
12. H. Nakamura, Y. Murakami, K. Yokoyama, E. Tamiya, I. Karube, M. Suda and S. Uchiyama, *Anal.Chem.* 2001, 73, 373-378.
13. A. Hemmi, K. Yagiuda, N. Funazaki, S. Ito, Y. Asano, T. Imato, K. Hayashi and I. Karube, *Anal.Chim.Acta* 1995, 316, 323-327.
14. J. Ballesta-Claver, M.C. Valencia-Miron and L.F. Capitán-Vallvey, *Anal.Chim.Acta* 2008, 629, 136-144.
15. J. Samsonova, V. M.Y. Rubtsova and M. Franek, *Anal.Bioanal.Chem.* 2003, 375, 1017-1019.
16. A. Hasegawa, Chemiluminescent analytical test strip and holder, JP 08184595, JP, 1994.
17. L.F. Capitán-Vallvey in *Encyclopedia of Sensors*, Grimes, C. A.; Dickey, E. C.Pishko, M. V., Eds. ed., 1 ed., The Pennsylvania State University, Pennsylvania, USA, 2005, 55-93.
18. M.M. Richter, *Chem Rev.* 2004, 104, 3003-3036.
19. C.A. Marquette, L.J. Blum, *Sens.Actuators B* 2003, B90, 112-117.
20. C.A. Marquette, A. Degiuli and L.J. Blum, *Biosensors Bioelectron.* 2003, 19, 433-439.
21. J.Y. Gal, Y. Fovet and M. dib-Yadzi, *Talanta* 2001, 53, 1103-1115.
22. D.-J. Oh, J.-Y. Lee, Y.-K. Kim and H.-S. Kho, *Int.J.Oral Maxillofac.Surg.* 2008, 37, 1027-1031.
23. G. Ramis Ramos, M.C. Garcia Alvarez-Coque in *Quimiometria*, Sintesis S.A., Madrid, 2000.
24. Boehringer Mannheim, Boehringer Mannheim L-lactate kit, 2006.
25. C.G.J. Schabmueller, D. Loppow, G. Piechotta, B. Schuetze, J. Albers and R. Hintsche, *Biosensors Bioelectron.* 2006, 21, 1770-1776.
26. I. Palchetti, S. Majid, A. Kicela, G. Marrazza and M. Mascini, *Intern.J. Environ. Anal. Chem.* 2003, 83, 701-711.
27. F. Mizutani, S. Yabuki and Y. Hirata, *Anal.Chim.Acta* 1995, 314, 233-239.
28. C. Chouteau, S. Dzyadevych, C. Durrieu and J.M. Chovelon, *Biosensors Bioelectron.* 2005, 21, 273-281.
29. E.V. Gogol, G.A. Evtugyn, J.-L. Marty, H.C. Budnikov and V.G. Winter, *Talanta* 2000, 53, 379-389.
30. N.M. Rao, K. Hool and T.A. Nieman, *Anal.Chim.Acta* 1992, 266, 279-286.
31. I. Palchetti, S. Laschi and M. Mascini, *Anal.Chim.Acta* 2005, 530, 61-67.
32. J. Gu, P. Xu and Y. Qu, *J.Mol.Catal.B: Enzym.* 2002, 18, 299-305.
33. G.P. Jirka, A.F. Martin and T.A. Nieman, *Anal.Chim.Acta* 1993, 284, 345-349.
34. M.M.J. Oosthuizen, M.E. Engelbrecht, H. Lambrechts, D. Greyling and R.D. Levy, *J.Biolumin.Chemilumin.* 1997, 12, 277-284.
35. B. Lillis, C. Grogan, H. Berney and W.A. Lane, *Sens.Actuators B* 2000, 68, 109-114.

36. O.M. Schuvailo, O.O. Soldatkin, A. Lefebvre, R. Cespuaglio and A.P. Soldatkin, *Anal.Chim.Acta* 2006, 573-574, 110-116.
37. H. Karatani, *Bull.Chem.Soc.Jpn.* 1987, 60, 2023-2029.
38. G.B. Schuster, *Acc.Chem.Res.* 1979, 12, 366-373.
39. B. Lillis, C. Grogan, H. Berney and W.A. Lane, *Sens.Actuators B* 2000, 68, 109-114.
40. B.B. Kim, V.V. Pisarev and A.M. Egorov, *Anal.Biochem.* 1991, 199, 1-6.
41. Y. Huang, W. Liu, *J.Pharm.Biomed.Anal.* 2005, 38, 537-542.
42. H.P. Misra, P.M. Squatrito, *Arch.Biochem.Biophys.* 1982, 215, 59-65.
43. L. Zhu, Y. Li, F. Tian, B. Xu and G. Zhu, *Sens.Actuators B* 2002, 84, 265-270.
44. S. Sakura, *Anal.Chim.Acta* 1992, 262, 49-57.
45. H.X. Yu, H. Cui, *J.Electroanal.Chem.* 2005, 580, 1-8.
46. Y. Su, J. Wang and G. Chen, *Anal.Chim.Acta* 2005, 551, 79-84.
47. K.E. Haapakka, J.J. Kankare, *Anal.Chim.Acta* 1982, 138, 263-275.
48. J. Lee, H.H. Seliger, *Photochem.Photobiol.* 1972, 15, 227-237.
49. W. Wang, H. Cui, Z.X. Deng, Y.P. Dong and J.Z. Guo, *J.Electroanal.Chem.* 2008, 612, 277-287.
50. Z. Lin, J. Sun, J. Chen, L. Guo and G. Chen, *Electrochim.Acta* 2007, 53, 1708-1712.
51. B.P. Corgier, C.A. Marquette and L.J. Blum, *Anal.Chim.Acta* 2005, 538, 1-7.
52. K.A. Fahrnich, M. Pravda and G.G. Guilbault, *Talanta* 2001, 54, 531-559.
53. G. Salgado, J. Navarrete, C. Bustos, C. Sanchez and R. Ugarte, *Quim.Nova* 2006, 29, 381-384.
54. N.J. Miller, J.C. Miller in *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*, 4 ed., Prentice Hall, Madrid, 2002.
55. F. Karaburun, PhD Thesis, Middle East Technical University, 2004.
56. G. Kyuchoukov, D. Yankov, J. Albet and J. Molinier, *Industrial & Engineering Chemistry Research* 2005, 44, 5733-5739.
57. G. Palleschi, M.H. Faridnia, G.J. Lubrano and G.G. Guilbault, *Anal.Chim.Acta* 1991, 245, 151-157.
58. S.A. John, *J.Electroanal.Chem.* 2005, 579, 249-256.
59. J. Wu, J. Suls and W. Sansen, *Electrochem.Comm.* 2000, 2, 90-93.
60. J.M. Zen, C.T. Hsu, *Talanta* 1998, 46, 1363-1369.
61. J. Marsh, G. Dryhurst, *J.Electroanal.Chem.* 1979, 95, 81-90.
62. N.G. Patel, A. Erlenkotter, K. Cammann and G.C. Chemnitz, *Sens.Actuators B* 2000, 67, 134-141.
63. A. Avramescu, T. Noguier, V. Magearu and J.L. Marty, *Anal.Chim.Acta* 2001, 433, 81-88.

64. F. Ghamouss, S. Ledru, N. Ruillq, F. Lantier and M. Boujtita, *Anal.Chim.Acta* 2006, 570, 158-164.

Table 1 Lactate biosensor analytical parameters

Parameter	Value	
Linear range, M	$10^{-5} - 5 \cdot 10^{-4}$	
Ordinate	4.12 ± 0.04	
Slope	0.91 ± 0.04	
r^2	0.992	
LOD, M	$5 \cdot 10^{-6}$	
RSD (%) blank (n=10)	5.13	
RSD (%) lactate (n=5)	$5 \cdot 10^{-5}$ M	3.91
	$2 \cdot 10^{-4}$ M	3.30
	$5 \cdot 10^{-4}$ M	4.20

Table 2 Comparison of lactate enzymatic-based biosensor characteristics.

Sensor	Range (M)	LOD (M)	Precision (%)	Application	Reference
Amperometric screen printed	10^{-6} - $5 \cdot 10^{-4}$	$5 \cdot 10^{-7}$	2.5	Dairy products, blood and serum	62
Amperometric screen printed	10^{-4} - 10^{-3}	$5 \cdot 10^{-5}$	10.8	Wine samples	63
Amperometric screen printed	10^{-7} - $1.8 \cdot 10^{-6}$	10^{-7}	3.0	Dairy products	64
Amperometric micromachined sensor	10^{-5} - $5 \cdot 10^{-3}$	---	5 - 12	Blood and saliva	25
CL disposable biosensor	$5 \cdot 10^{-5}$ - $4 \cdot 10^{-3}$	$9.2 \cdot 10^{-6}$	5.5	Yoghurt	14
ECL Biosensing chip	$2 \cdot 10^{-6}$ - $2 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-6}$	< 8.0	Serum	20
ECL Screen printed	$3 \cdot 10^{-7}$ - 10^{-4}	$3 \cdot 10^{-7}$	4.4	---	51
ECL disposable biosensor	10^{-5} - $5 \cdot 10^{-4}$	$5 \cdot 10^{-6}$	3.9 - 4.2	Saliva	This paper

Table 3. Contribution of different saliva components to ECL signal.

Components*	% Decrease in ECL signal
CaCl ₂	0.0
KCl	0.0
NH ₄ Cl	0.3
Lactate	0.0
Citric acid	2.5
Ascorbic acid	98.3
Uric acid	98.9
KSCN	6.8
CMC**	0.0

*Tested at the concentrations of artificial saliva;

**CMC: carboxymethyl cellulose.

Table 4 Determination of lactate in saliva by proposed and reference procedures

Saliva Sample	ECL Biosensor (M)	Reference (M)	M.C.P. ^a (%)	P _{val} (%)
1 [*]	$(3.10 \pm 0.25) \cdot 10^{-4}$	$(3.11 \pm 0.13) \cdot 10^{-4}$	99.6	94.6
2 ^{**}	$(6.9 \pm 1.5) \cdot 10^{-4}$	$(8.39 \pm 0.79) \cdot 10^{-4}$	82.2	35.9
3 [*]	$(3.37 \pm 0.01) \cdot 10^{-4}$	$(3.39 \pm 0.35) \cdot 10^{-4}$	99.4	94.3

^a M.C.P.: methods comparison percent.^{*} Male; ^{**} Female

FIGURE LEGENDS

Fig. 1 Configuration of the instrumental setup for lactate determination.

Fig. 2 Optimization of membrane composition. A) The ECL signal increases with Methocel reaching a maximum at $49.9 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. B) The LOx concentration produces a maximum at $12.5 \text{ IU}\cdot\text{ml}^{-1}$. C) BSA dependence shows a maximum at $100 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ D) Luminol dependence. In all cases 10^{-4} M of lactate concentration was used.

Fig. 3 A) Dependence of ECL signal on voltage applied during 1 s. B) Cyclic voltammogram of luminol.

Fig. 4 The pH optimization for lactate biosensor. Figure 4A shows a maximum at pH 10.5 working at a constant lactate concentration (10^{-4} M) although with poor repeatability when pH increases because the blank signal increases. In Figure 2B a S/N representation is presented obtaining the maximum at pH 9.0, which was selected.

Fig. 5 A) Set of consecutive pulses of 1 s at 0.5 V each 10 s. The inset shows an enlargement of the two first pulses used for analytical signal acquisition. The experimental conditions were pH 9.0 phosphate buffer 0.2 M, 0.25 M NaCl and $2\cdot 10^{-3} \text{ M}$ of luminol. B) Log-log calibration curve for lactate using five replicates for concentration.

Fig. 6 Shewhart diagram for lifetime of disposable lactate biosensor.

Fig. 7 A) Voltammogram from a solution of ascorbic acid (10^{-3} M) and uric acid ($5\cdot 10^{-3} \text{ M}$) at pH 9.0 phosphate buffer 0.2 M and 0.25 M NaCl. B) Effect of different uric acid concentrations on lactate calibration curve: (a) no addition; (b) $2\cdot 10^{-4} \text{ M}$ and (c) $5\cdot 10^{-3} \text{ M}$.

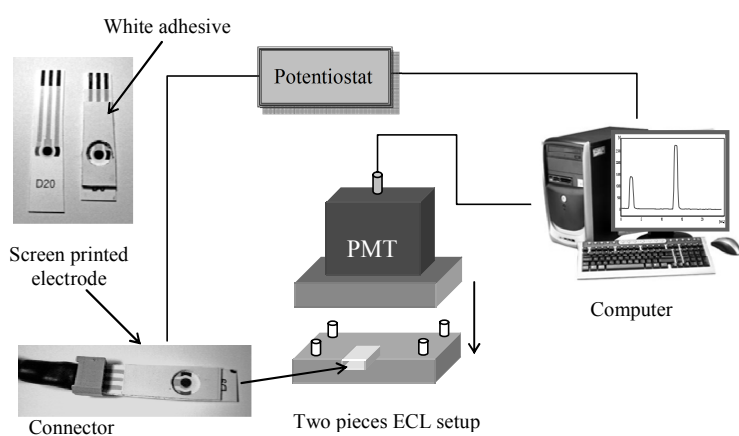


Fig. 1

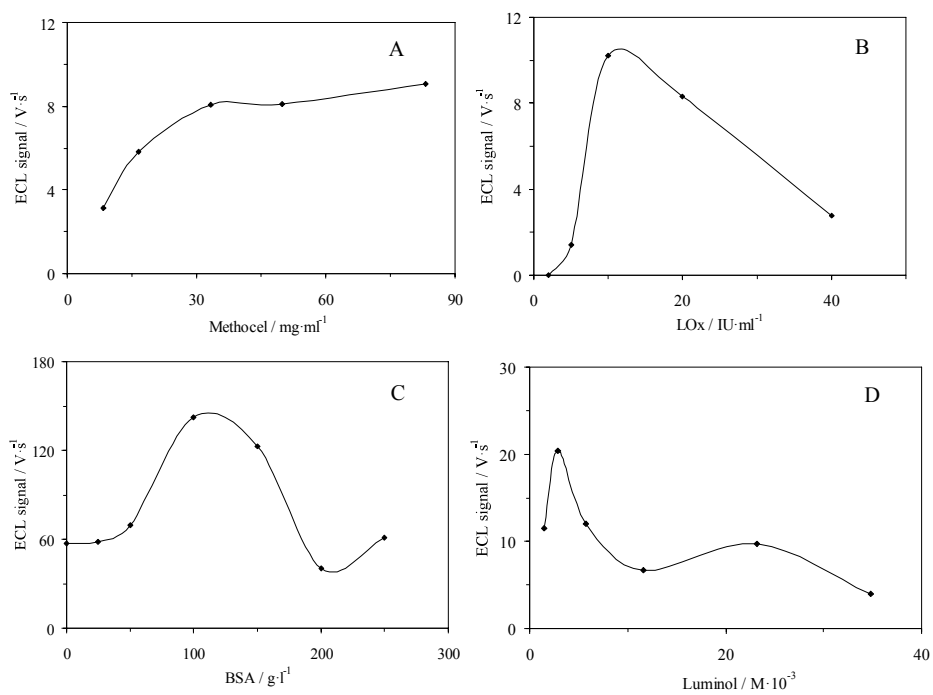


Fig. 2

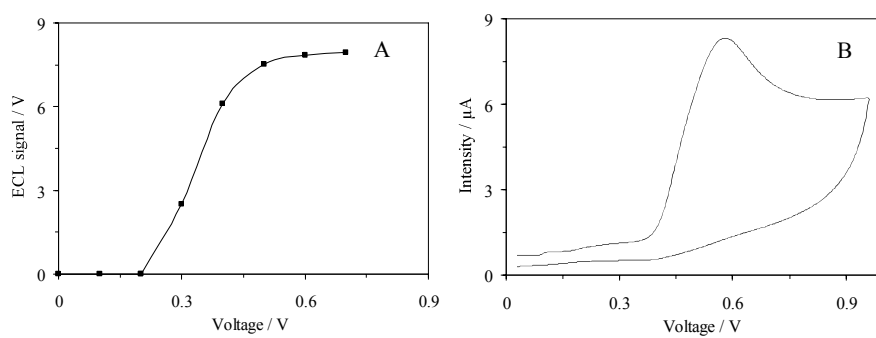


Fig. 3

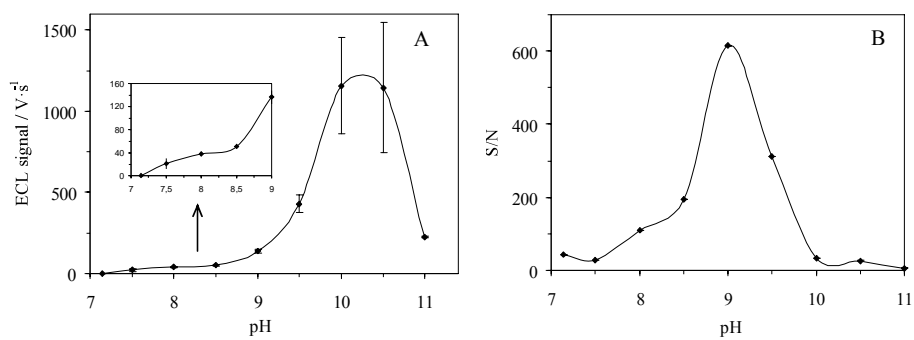


Fig. 4

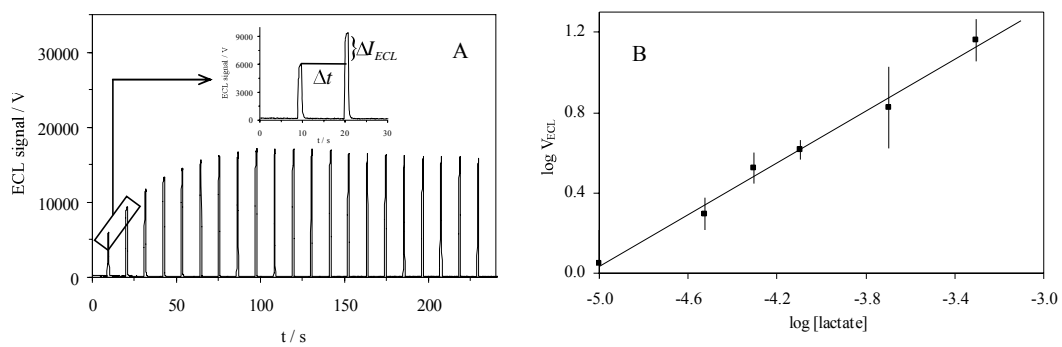


Fig. 5

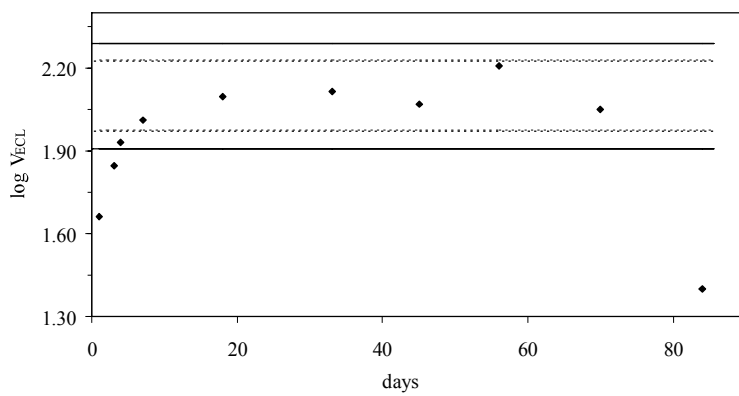


Fig. 6

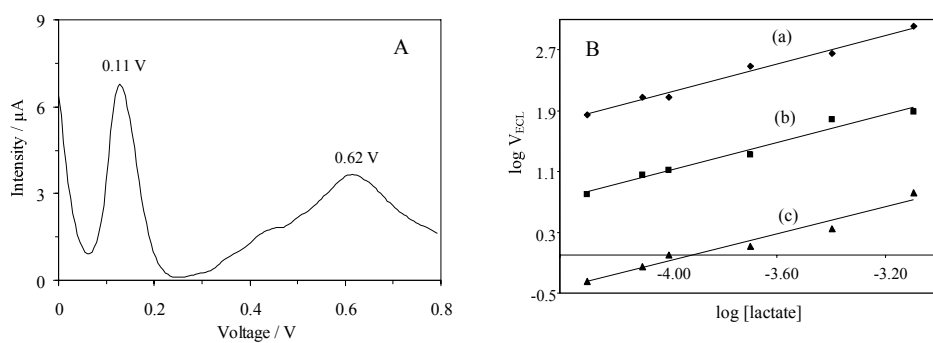


Fig. 7

**ANALYSIS OF PARABENS IN COSMETICS BY LOW-PRESSURE LIQUID-
CHROMATOGRAPHY WITH MONOLITHIC COLUMN AND
CHEMILUMINESCENT DETECTION**

*J. Ballesta-Claver, M.C. Valencia-Miron and L.F. Capitán-Vallvey**
*Solid Phase Spectrometry Research Group, Department of Analytical Chemistry,
Campus Fuentenueva, Faculty of Sciences, University of Granada,
E-18071 Granada, Spain.*

Abstract

This paper presents an application of chromatographic separation based on an ultra-short monolithic column and chemiluminescent detection in an FIA type instrument manifold for the determination of four paraben mixtures: methylparaben (MP), ethylparaben (EP), propylparaben (PP) and butylparaben (BP). The separation is achieved in 150 s using two consecutive carriers: first 12% ACN:water that changes 75 s after injection to 27% ACN:water. The detection is based on the oxidation of the hydrolysis product of parabens, p-hydroxybenzoic acid, with Ce (IV) in the presence of Rhodamine 6G which evokes chemiluminescence of sufficient intensity to enable a sensitive determination of these species. After optimization of the variables involved, the analytical method is characterized, displaying the following values for concentration ranges, detection limits and precision, as relative standard deviation at low concentration ($0.15 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$): MP: from $9.85\cdot 10^{-7}$ to $3.28\cdot 10^{-4}$ M; $1.91\cdot 10^{-8}$ M; 5.56 %; EP: from $9.02\cdot 10^{-7}$ to $3.28\cdot 10^{-4}$ M; $2.83\cdot 10^{-8}$ M; 3.49 %; PP: from $8.32\cdot 10^{-7}$ to $9.86\cdot 10^{-5}$ M; $2.33\cdot 10^{-8}$ M; 4.22 %; and BP: from $7.72\cdot 10^{-7}$ to $9.86\cdot 10^{-5}$ M; $4.22\cdot 10^{-8}$ M; 6.22 %. The method was applied and validated satisfactorily for the determination of these parabens in cosmetic samples, comparing the results against an HPLC reference method.

Key words. Parabens determination; Chemiluminescence; Monolithic mini-column; Low-pressure liquid chromatography; Cerium (IV)-Rhodamine 6G chemistry; Cosmetics.

* Corresponding author. E-mail: lcapitan@ugr.es (L.F. Capitán-Vallvey).

1. INTRODUCTION

The combination of chromatography with flow techniques offers some interesting characteristics. Flow methods present advantages in simplicity, low cost, versatility, speed, and, usually, good analytical figures, but typically do not allow the separation of analyte mixtures. Liquid chromatography is a well-established technique with high selectivity and performance, but it requires much more expensive instrumentation than flow techniques. This justifies the combination of flow techniques, such as flow injection analysis (FIA) [1], sequential injection analysis (SIA) [2] and multisyringe flow injection analysis (MSFIA) [3] with low pressure chromatographic separations to achieve selective low-cost methodology.

The key of this merging of techniques are monolithic columns, a high cross-linked porous monolithic polymer, with well-defined, bimodal pore-size distribution, mesopores for retention and larger macropores for through-flow that provide good separation power and high chemical stability and flow characteristics (up to $15 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$) [4,5].

Different combinations of flow techniques and monolithic materials have been used for separations of drug mixture [1-3,6,7], pollutants such as polyaromatic hydrocarbons [8] and inorganic cations and anions mixtures [5,9-11]. In all these methods, the detector used is DAD or conductivity.

Chemiluminescence (CL), observed when the vibronically excited product of an exoergic reaction relaxes to its ground state with the emission of photons, has been widely used as a detection method in different techniques such as HPLC, capillary electrophoresis, thin layer chromatography and FIA [12]. In this paper we are interested in the use of chemiluminescence detection in low pressure chromatographic separations using a FIA system that includes a monolithic column, due to the good detection limits and versatility, in order to improve the characteristics of these methods.

There are different types of chemistries used for CL generation, but one of the most useful is the combination of Ce (IV) and Rhodamine 6G. This reaction was applied with FIA to determine different compounds such as chlorpromazine [13], phentolamine [14], hydrochlorothiazide [15], ferulic acid [16] and parabens [17]. All these FIA determinations were performed without any separation steps.

CL detection has rarely been used in low pressure chromatographic systems with a monolithic column using FIA manifolds. Thus, Adcock *et al.* [1] propose a hybrid FIA/HPLC system for the separation of six alkaloids and four biogenic amines using a 25 mm length monolithic column with tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(III) and permanga-

nate CL detection. Paull *et al.* [18] use a 3 mm long chelating monolithic disk for the selective retention and CL determination of Cu(II) based on 1,10-phenanthroline and hydrogen peroxide chemistry.

Parabens are a homologous series of hydroxybenzoic acid esterified at the C-4 position, including methyl, ethyl, propyl and butyl, used as an antimicrobial in foods, beverages, pharmaceuticals and cosmetics [19,20]. Their presence in cosmetics, especially for consumers that use them in a daily basis and in large quantities, could induce allergic contact dermatitis [21]. Their uses are regulated by Cosmetic Directive 76/768/EEC in amounts up to a maximum concentration of 0.4 % in the finished product for 1 ester and up to 0.8 % for mixtures of esters [22].

We have previously studied the separation of parabens alone [23] or in mixtures with other additives [24] using a low pressure chromatographic system with a monolithic column and spectrophotometric detection. The aim of this paper is to use chemiluminescence as a detection system for parabens determination to increase the sensitivity of the method and its application to cosmetics analysis.

2. EXPERIMENTAL

2.1. Reagents and Chemicals

Methylparaben (MP) (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, Spain, 99 %), ethylparaben (EP), propylparaben (PP), and butylparaben (BP) (last three from Fluka, Madrid, Spain, 99 %) $1.6 \cdot 10^{-2}$ M stock solutions were prepared by exact weighing of each compound and dissolution in acetonitrile (ACN) (Panreac Química S.A, Barcelona, Spain, 99.9 % v/v HPLC grade). These solutions were spectrophotometrically stable when protected from light and kept in the refrigerator at 4°C at least for two months. Working solutions were prepared by appropriate dilution with water while maintaining 12 % (v/v) ACN. A working standard solution containing the four parabens at $6.57 \cdot 10^{-4}$ M each were prepared and kept in the refrigerator at 4 °C.

The CL reagents used were 10^{-2} M ammonium cerium (IV) sulfate dihydrate (99 %) and 1 M of sulfuric acid, both by Merck (Madrid, Spain) and 10^{-3} M of Rhodamine 6G chloride (Rho 6G) 95 % by Sigma. All chemicals used were of analytical-reagent grade. Aqueous solutions were prepared using reverse-osmosis type quality water produced by a Milli-RO 12 plus Milli-Q purification system (Millipore, Bedford, MA, USA).

2.2. Apparatus and Software

The flow analysis set-up consisted of two Gilson Minipuls-2 (Gilson, Inc., Middleton, USA) four channel peristaltic pumps working at a constant flow-rate and two variable volume Rheodyne 5041 teflon rotary valves (one as injection valve and another as selection valve). PTFE tubing (Omnifit, Cambridge, England) (0.8 mm i.d. and 1.6 mm o.d.) and various end-fittings and connectors of different diameters were used. As the separation element in the flow system we used a C₁₈ monolithic mini-column (Chromolith Guard Cartridge RP-18 endcapped) (5 mm×4.6 mm i.d.) from Merck (Darmstadt, Germany). Chemiluminescence measurements were performed with a CL-1 Camspec luminometer (Camspec Ltd., Cambridge, UK) interfaced to a personal computer via an INT7 - 24 bit A/D integration board.

Other instruments used were a Hewlett Packard HP-8453 diode array spectrophotometer (Nortwalk, CT, USA) interfaced to a PC and equipped with a Hellma 138-QS flow cell with 1 mm light path, an Agilent 1100 series liquid chromatograph with DAD detector provided with a C₈ Zorbax column used to validate the proposed method and a Crison digital pH-meter with combined glass-saturated calomel electrode (Crison Instruments, Barcelona, Spain). Software programs used to treat the data were: CSW32 software package supplied by DataApex Ltd. v 1.2.5 (2001) (Prague, Czech Republic) used for the acquisition and manipulation of the luminescence data; Statgraphics software package (Manugistics Inc. and Statistical Graphics Corporation, USA, 1992), ver.4.0 (1993) and Microsoft Office 2003.

2.3. Procedure

2.3.1. Standards and samples

A standard or sample solution containing between 10⁻⁶ to 10⁻⁴ M each in MP, EP, PP and BP was inserted into the flow analysis system through a loop valve injector of 75 µl of capacity with the same composition as the carrier A. The carrier A stream (12% ACN:H₂O v/v) at a flow-rate of 2.6 ml·min⁻¹ was changed to carrier B (27% ACN:H₂O v/v) 75 s after the injection valve was opened, through the selection valve. After the sample plug reached the monolithic mini-column, the carrier containing the already separated analytes was mixed using a 4-way connector with two solutions for CL generation at a flow rate of 2.5 ml·min⁻¹ using a second peristaltic pump. The first solution was 2·10⁻² M of Ce (IV), dissolved in 2M H₂SO₄, and the second 4·10⁻⁴ M Rho 6G. The CL analytical signal used for paraben determination corresponds to the difference between the maximum CL intensity (I_{standard}) and CL background (I_{background}). The relation-

ship between the concentration and peak height was established by conventional calibration with external standards.

Figure 1

2.3.2. Reference

As reference method, an adaptation of the HPLC-DAD method proposed by Borremans *et al.*[25] was used. A 5 μm C₈ silica in a 150 x 4.6 mm column along with water/acetonitrile/methanol/tetrahydrofuran (60/25/10/5) isocratic mobile phase at a constant flow rate of 1.0 ml·min⁻¹ were used. The chromatograms were obtained at a wavelength of 254 nm. To obtain the calibration function, 5 different concentrations and 3 replicates each of the different parabens with peak height as analytical parameter were used.

2.3.3. Maintenance

For correct maintenance of the flow system, especially the mini-column, before the analysis carrier A had to be passed at a flow rate of 2.6 ml·min⁻¹ for 5 min to condition the mini-column. After the analysis and when the last peak arrived at the baseline, 150 s after injection valve was opened, the flow system was conditioned again with carrier A for 30 s. In order to improve the lifetime of the mini-column, after use it was washed for 5 min with carrier A and then with water for another 5 min.

2.4. Sample preparation

For the analysis of the cleaning mousse, an adequate amount (typically 1 g) was weighed, and mixed with 5 ml of MeOH. The solution was sonicated for 10 minutes, and filtered through 0.45 μm filters[26]. An adequate amount of this filtrate was diluted to 10 ml.

For the analysis of cleaning towels, an adaptation of the procedure proposed by Saas *et al.*[27] was applied. An adequate amount (typically 3 g) was weighed and cut into strips to improve contact with the solvent. 25 ml of ACN were added and placed in an ultrasonic bath for 30 min at 50 °C and then the mixture was filtered through a 0.45 μm filter. Finally, the solution was evaporated to dryness and dissolved with 10 ml of ACN.

In both cases the basic procedure was applied to the samples. Samples were measured in triplicate and the mean peak height values were used for data acquisition.

3. RESULTS AND DISCUSSION

The widely used alkyl hydroxybenzoates (as preservatives) are a mixture of the first four homologues and their resolution requires a separation step. In a previous paper[23] we studied the feasibility of that separation using a monolithic mini-column included in a flow system with UV detection. Here we combined the separation ability of monolithic mini-columns with the advantages of chemiluminescent detection for paraben analysis. The typical advantages in terms of selectivity, by choosing the suitable chemiluminescent chemistry, and sensitivity, as is usual with an emissive technique, were observed. Next we studied first the chromatographic separation of parabens with an FIA system using simple spectrophotometric detection, and second, their post-column CL detection, considering the influence of separation conditions on this CL detection.

3.1. Separation procedure

As a separative element, a monolithic mini-column, the Chromolith commercial guard cartridges, C₁₈ reverse phase silica 5 mm in length and 4.6 mm diameter, was selected. The use of this ultra-short monolithic column made it possible to solve the usual pressure drop when conventional filled mini-columns are used, hindering the use of normal peristaltic pumps[5]. In this case, the system back pressure was reduced using tubing with 0.8 mm i.d. being the maximum flow rate attained 2.6 ml·min⁻¹.

The main variables that influence separation are the carrier composition used, typically made up of a buffer to adjust the pH and a percentage of organic solvent to adjust polarity. As the four parabens have very similar pK_a (MP 8.87; EP 8.90; PP 8.87 and BP 8.79)[28], pH is not very relevant for paraben separations for which reason we did not use any buffer. Additionally, we did not adjust the acidity conditions required for CL reaction (H₂SO₄ 2M) to prevent the hydrolysis of parabens during separation.

Of the several carriers tested, the best results were obtained with ACN/water and MeOH/water mixtures. After comparing both carriers, we selected the ACN/water solution because it needed a lower percentage of ACN to obtain the same results than the MeOH/water carrier, reducing waste in the environment. The retention behaviour of parabens is according to their polarity: MP<EP<PP<BP (the more methylene groups the molecule has, the greater the retention time; log P: 1.91 MP; 2.34 EP; 2.94 PP; 3.50 BP[28]), as expected (Figure 2). Additionally, if we consider the effect of both solvents in CL detection, we observe a decrease in CL emission. Thus, 20 % MeOH means a

decrease in CL of 34.7 % and 15 % ACN means a reduction in CL of 5.3 %, a similar effect to that described by Santiago *et al.*[29]. This fact also supports the selection of ACN:water as a carrier.

Figure 2

As Figure 2A shows, the resolution of four parabens in the mini-column is possible working in isocratic mode, but the analysis time is too high (up to 900 s). The first solution tested was to increase the flow rate, but even working at the highest flow rate tested ($2.6 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$), the analysis time is still too high (up to 600 s) because of the high retention times for PP and BP. Consequently, we selected $2.6 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ as the flow rate and studied the minimization of the analysis time by decreasing the polarity of the carrier, switching after MP and EP were eluted (75 s after injection) to a new carrier B, composed of 27 % ACN/water. In this way, PP and BP are sped up as seen in Figure 2B.

The consecutive use of these two carriers makes it possible to obtain a good resolution between all peaks ($R_s > 1.2$) and a reasonable analysis time (150 s). With carrier A, ACN/water 12 %, we separated MP and EP and with carrier B, ACN/water 27 %, PP and BP. In those conditions, the retention times for the four parabens are: 29 s MP, 65 s EP, 104 s PP and 125 s BP.

3.2. Optimization of CL detection

The optimization of the CL conditions was studied independently and univariantly for each paraben and compromise values were selected. In this case, the configuration of the FIA manifold is different from other cases previously described for CL detection[17,30] in order to prevent the saturation of the mini-column with Rho 6G which decreases performance. For this reason we used different flow lines for Rho 6G and the parabens.

3.2.1. Total flow rate.

As seen in Figure 1, we used two peristaltic pumps for the two stages of the setup: separation and detection. Since the flow rate of the pump used for separation was set at $2.6 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, we studied the dependence of CL emission with respect to the total flow rate achieved, by adjusting the flow rate of the pump used for CL detection. Figure 3 shows that CL emission increases with the flow rate up to $5.1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, and then decreases. This means that the maximum CL emission increases as the flow rate does when the reaction is produced closer to the flow cell, but at higher rates, the CL emission maxima

moves away from the flow cell and the signal decreases. Thus, we worked at $2.5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ for the flow rate of the pump used for CL detection.

Figure 3

3.2.2. H_2SO_4 concentration

Detection, which involves Ce(IV) and different fluorophores such as Rho 6G, requires strong acidic conditions, coming in this case from the H_2SO_4 used for the Ce (IV) solution. Figure 4A shows a maximum emission at 2 M H_2SO_4 for all parabens. This behaviour is due to the fact that the higher the H_2SO_4 concentration, the higher the hydrolysis of parabens, increasing the signal according to the CL mechanism[17]. The explanation for this is shown in the following mechanism section.

3.2.3. Loop volume

We studied loops of different lengths, and consequently different volumes, from 20 to 150 μl . As is usual with chromatography, the width of the peak increased with the volume and the resolution decreased at higher volumes. Additionally, Figure 4B shows a small increase in the CL signal with the loop volume. When the loop volume increased from 20 to 150 μl , the chromatographic parameters increased; thus the retention time (13.1% for MP, 13.5% for EP, 15.0% for PP, 13.3% for BP); height (100.8% MP, 97.0% EP, 89.3% PP, 119.6% BP); area (135.8% MP, 123.3% EP, 99.1% PP, 106.9% BP); bandwidth (30.8% MP, 4.8% EP, 9.1% PP, 20.0% BP); resolution (constant between 3-3.5 in all cases) and analysis time (14.3%). Volumes greater than 150 μl give strongly overlapping results ($R_s < 0.5$). We selected 75 μl as the optimum loop volume as a compromise between the analytical signal, analysis time and bandwidth.

Figure 4

3.2.4. Cerium (IV) concentration

The effect of Ce (IV) concentration on the CL intensities of parabens was examined. Different concentrations between $6\cdot 10^{-3}$ M and $6\cdot 10^{-2}$ M were used obtaining the best CL signal for the parabens at $2\cdot 10^{-2}$ M (Figure 4C). The decrease of the signal at higher Ce(IV) concentrations has been described in the literature and ascribed either: 1) to an absorption of radiation by the excess of yellow Ce (IV) solution[17] or 2) to the fact that the maximum of the reaction occurs before the solution reaches the luminometer because the reaction rate increases with Ce(IV) concentration[31]. In order to study the reason of this influence, we performed an indirect experiment using a new FIA manifold (Figure 5). We observed that an increase in distance B (> 5 cm) decreased the CL signal (Figure 5B), due to the fact that the maximum CL emission occurred inside the tubing,

before reaching the flow cell, when we increased its length at a constant Ce(IV) concentration, which agrees with the hypothesis of Yuming Huang *et al.*[31].

3.2.5. Rhodamine 6G concentration

The concentration of aqueous Rho 6G, studied from 10^{-4} to $8 \cdot 10^{-4}$ M, also affected the CL signal (Figure 4D). As the working concentration, we selected $4 \cdot 10^{-4}$ M because of its better repeatability. When the concentration of Rho 6G increases, the CL emission decreases slowly because of the formation of nonfluorescent dimers of Rho 6G which act as an efficient quencher of the monomer[32].

3.2.6. Ionic strength

Ionic strength was studied by adding different amounts of NaCl to the carrier (up to 0.25 M), having, as could be expected for these analytes, no influence on the retention times, although a small influence in peak height was observed (for MP, PP and BP increases 2.1 %, 7.6 % and 7.6 %, respectively, and for EP a 5.1 % decrease). Consequently, no salt was added to the carrier.

Figure 5

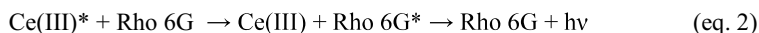
3.3. Chemiluminescence mechanism

The mechanism of the Ce(IV)-Rho 6G reaction has been studied extensively in the literature[30,33-35] and its reaction mechanism with parabens has been discussed by Zhang *et al.*[26] and Hua Cui *et al.*[17]. Here we discuss the mechanism and offer some additional data to confirm it.

When Ce(IV) reacts with Rho 6G a small chemiluminescent emission occurs, as can be observed by the small peak at the beginning of the CL record in Figure 5C. This emission is due to the redox reaction:



The $\text{Rho 6G}_{\text{ox}}$ is non fluorescent[36] and the Ce(III) is in excited state. This Ce(III)* can return to his fundamental state with a small CL emission, but in the presence of fluorophore Rho 6G transfers its energy, emitting more fluorescence[30].



The addition of a phenolic compound, as is the case with parabens, to this redox reaction strongly increases the CL emission. For parabens, it has been suggested that the reaction is due to the p-hydroxybenzoic acid (PHBA) generated by acidic hydrolysis



where RH is the corresponding alcohol.

Produced PHBA is easily oxidized by Ce (IV) producing Ce(III)* as was experimentally observed by Hua Cui *et al.*[17] giving the corresponding oxidation products that consists of 3,4-dihydroxybenzoic acid, 1,4-hydroquinone and 1,4-benzoquinone [37], indicated as PHBA_{ox} in the following equation.



This Ce(III)* in the presence of Rho 6G gives rise to a more intense emission because of the higher Ce(III)* production from PHBA[33] (eq. 2).

Indeed, we observed that PHBA produced the CL emission, but we checked that different parabens working at the same concentration (see Figure 5C) produced a different CL intensity. This apparently contradictory result could be ascribed to the different hydrolysis rate of each paraben. An increase in the alkyl chain length of parabens increases their resistance to hydrolysis[19], because of the basic constant pK_b [38] of the leaving group (29.5 for methyl, 29.9 ethyl, 30.2 propyl and 30.5 butyl groups) which increases when the carbon chain does, hindering the leaving of the alkyl chain from the molecule and lowering the CL signal, data that agrees with the enzymatic hydrolysis study of parabens by Valkova *et al.*[39]. Thus, each peak in Figure 5C corresponds to the PHBA coming from a different hydrolyzed paraben.

The suggested mechanism means that the higher the PHBA amount, the higher the CL emission. Thus, it is possible to conceive of a FIA manifold with prior mixing of parabens with Ce(IV) in H_2SO_4 and subsequent merging with the Rho 6G flow, but this manifold gave unsatisfactory results because of the short life (milliseconds) of the Ce(III)* produced in the first step. To support the above mechanism, it is assumed that those equations 1 and 4 occur at the same time, but in a different extension, and thus we used different FIA manifolds, shown in Figure 5, to separate the reagent mixing. If Ce (IV) is mixed first with parabens, a higher hydrolysis and more CL emission occur. We observed this behaviour when we used a short tube from the injection valve to the T-connector (Figure 5A), because at this length (15 cm) there is no time to complete the mixing of the Rho 6G with the paraben in the flow line. When all the reagents are mixed together (Figure 5A, length tube > 60 cm) the CL emission is lower due to lower Ce(III)* production. One question remains: the high CL emission with the short tubing despite the lower amount of Rho 6G needed. We assume that the strong retention of Rho 6G in materials like glass or quartz, observed here in the flow cell, is responsible for this intense emission.

3.4. Analytical parameters

The calibration functions for each paraben were obtained using eight standards and three replicates each and all responded to a linear function with the form: $I = a \cdot X + b$.

Table 1

Table 1 presents the analytical parameters for the proposed paraben determination. The dynamic ranges obtained were: $9.85 \cdot 10^{-7}$ to $3.28 \cdot 10^{-4}$ M for MP; $9.02 \cdot 10^{-7}$ to $3.28 \cdot 10^{-4}$ M for EP; $8.32 \cdot 10^{-7}$ to $9.86 \cdot 10^{-5}$ M for PP and $7.72 \cdot 10^{-7}$ to $9.86 \cdot 10^{-5}$ M for BP. The limit of detection (LOD) ($K = 3$) and the limit of quantification (LOQ) ($K = 10$) were estimated according to IUPAC, with the standard deviation of the background signal measured for the blank. Table 1 presents the relative standard deviation, RSD, at two paraben concentrations, $0.15 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ and $15 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. The sampling frequency was approx. 20 h^{-1} . The proposed method shows satisfactory results for quantification of each paraben in the presence of the different ratios of the co-existing parabens. From Table 1 it is apparent that the use of the peak area as the analytical parameter presents more sensitivity but lower repeatability than using the peak height. For that reason, we chose the peak height, as is usual with chemiluminescent methods, for the analytical applications.

Comparing the analytical characteristics of the different methods for paraben analysis found in the literature (Table 2), we observed that the HPLC shows the highest lineal range when compared to low pressure flow techniques and capillary electrophoresis. Moreover, the use of CL detection decreases the LOD in general (tenfold lower) as well as the repeatability, and increases the lineal range (one range). It is apparent that the coupling of chemiluminescence for detection in separation techniques improves the analytical determination of parabens.

Table 2

3.5. Analytical applications

The proposed method was applied to cosmetics samples (cleaning towels and cleaning mousse). One of them contained only three parabens (cleaning towels) and the other contained the four (cleaning mousse).

Figure 6

For the extraction of parabens in the cosmetics products studied, we used an adaptation of the procedure based on ACN proposed by Saas *et al.*[27] for the cleaning towels and on the use of MeOH for the cleaning mousse[26]. The quantitiveness of the extraction

procedures was tested through the addition of known amounts of each paraben. Recoveries of the different parabens (Table 3) ranged between 92.0 and 111.4 %.

Table 4 shows that the proposed CL method is validated by comparison with an HPLC reference method[25]. This table includes the mean values from 3 determinations of the samples, standard deviations of these measurements and the probability value (P_{val}) of the test used to compare the results obtained for both methods.

The proposed method has several advantages over the usual HPLC method: it uses very simple, fast instrumentation that is cheaper and has better detection limits. The drawbacks of this methodology concern its lower precision and limited capacity for separation due to the column length, although it is sufficient for the determination of these parabens.

Table 2

Table 3

4. CONCLUSIONS

We succeeded in separating the mixture of four parabens MP, EP, PP and BP using a low pressure chromatographic system with an ultra short monolithic column (5 mm) with chemiluminescent detection. The use of chemiluminescent detection based on the Ce(IV)-Rhodamine 6G chemistry improves the lineal range and lowers the detection limit some two orders of magnitude with respect to spectrophotometric detection while maintaining the precision. CL detection increases the sensitivity of the method for its application to cosmetics analysis. The results were chemometrically validated and compared with an HPLC reference method. The described method is practical, simple, rapid and inexpensive and can determine the parabens at $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ with a precision between 2 and 6 %. It would be possible to use this method for routine analysis considering its short analysis time (150 s) and easy maintenance.

Acknowledgements

We acknowledge financial support from *Ministerio de Educación y Ciencia, Dirección General de Enseñanza Superior* (Spain) (Projects CTQ2005-09060-CO2-01, CTQ2005-09060-CO2-02 and P06-FQM-01467).

References

1. J.L. Adcock, P.S. Francis, K.M. Agg, G.D. Marshall, N.W. Barnett, *Anal.Chim.Acta* 600 (2007) 136.
2. P. Chocholous, D. Satinsky, P. Solich, *Talanta* 70 (2006) 408.
3. H.M. Gonzalez-San Miguel, J.M. Alpizar-Lorenzo, V. Cerda-Martin, *Talanta* 72 (2007) 296.
4. K. Cabrera, *J.Sep.Sci.* 27 (2004) 843.
5. S. Pelletier, C.A. Lucy, *J.Chromatog.A* 1118 (2006) 12.
6. D. Satinsky, J. Huclova, R.L.C. Ferreira, M.C. Montenegro, P. Solich, *J.Pharm.Biomed.Anal.* 40 (2006) 287.
7. J. Klimundova, D. Satinsky, H. Sklenarova, P. Solich, *Talanta* 69 (2006) 730.
8. P.N. Nesterenko, M.A. Rybalko, *Dokl.Chem.* 404 (2005) 178.
9. B. Paull, C.O. Riordain, P.N. Nesterenko, *Chem.Comm.* (2005) 215.
10. D. Connolly, D. Victory, B. Paull, *J.Sep.Sci.* 27 (2004) 912.
11. D. Victory, P. Nesterenko, B. Paull, *Analyst* 129 (2004) 700.
12. C. Dodeigne, L. Thunus, R. Lejeune, *Talanta* 51 (2000) 415.
13. Y. Huang, Z. Chen, *Talanta* 57 (2002) 953.
14. W. Liu, Y. Huang, *Anal.Chim.Acta* 506 (2004) 183.
15. J.A. Murillo Pulgarin, A. Alanon Molina, G. Perez-Olivares Nieto, *Anal.Chim.Acta* 518 (2004) 37.
16. J.P. Wang, N.B. Li, H.Q. Luo, *Spectrochim.Acta A* 71 (2008) 204.
17. A. Myint, Q. Zhang, L. Liu, H. Cui, *Anal.Chim.Acta* 517 (2004) 119.
18. E. Tyrrell, P.N. Nesterenko, B. Paull, *J.Liquid Chromatog.Rel.Tech.* 29 (2006) 2201.
19. M.G. Soni, I.G. Carabin, G.A. Burdock, *Food Chem.Toxicol.* 43 (2005) 985.
20. S.H. Kang, H. Kim, *J.Pharm.Biomed.Anal.* 15 (1997) 1359.
21. E. Nettis, M. Marcandrea, M.C. Colanardi, M.T. Paradiso, A. Ferrannini, A. Tursi, *Allergy* 58 (2003) 1304.
22. Scientific Committee on Consumer Products. Extended Opinion on the Safety Evaluation of Parabens. SCCP/0873/05, 1-11. 2005.
23. J.F. Garcia-Jimenez, M.C. Valencia-Miron, L.F. Capitan-Vallvey, *J.Anal.Chem.* In press (2008) .

24. J.F. Garcia-Jimenez, M.C. Valencia, L.F. Capitan-Vallvey, *Anal.Chim.Acta* 594 (2007) 226.
25. M. Borremans, J. van Looc, P. Roos, L. Goeyens, *Chromatographia* 59 (2004) 47.
26. Q. Zhang, M. Lian, L. Liu, H. Cui, *Anal.Chim.Acta* 537 (2005) 31.
27. B. Saad, M. Bari, M.I. Saleh, K. Ahmad, M. Talib, *J.Chromatog.A* 1073 (2005) 393.
28. T. Angelov, A. Vlasenko, W. Tashkov, *J.Liquid Chromatog.Rel.Tech.* 31 (2008) 188.
29. R. Santiago Valverde, I. Sanchez Perez, F. Franceschelli, M. Martinez Galera, M.D. Gil Garcia, *J.Chromatog.A* 1167 (2007) 85.
30. H. Cui, Q. Zhang, A. Myint, X. Ge, L. Liu, *J.Photochem.Photobiol., A* 181 (2006) 238.
31. W. Liu, Y. Huang, *Anal.Chim.Acta* 506 (2004) 183.
32. T. Taguchi, S. Hirayama, M. Okamoto, *Chem.Phys.Lett.* 231 (1994) 561.
33. Y. Huang, Z. Chen, *Talanta* 57 (2002) 953.
34. W. Liu, Y. Huang, *Anal.Chim.Acta* 506 (2004) 183.
35. Y. Ma, X. Jin, M. Zhou, Z. Zhang, X. Teng, H. Chen, *Anal.Chim.Acta* 489 (2003) 173.
36. S. Feng, X. Chen, G. Zhang, J. Fan, Lihua Jianyan, *Huaxue Fence* 39 (2003) 221.
37. C.K. Duesterberg, T.D. Waite, *Environ.Sci.Technol.* 41 (2007) 4103.
38. Vollhardt, K.; Schore, N. *Organic Chemistry*, 2 ed.; Freeman and Company, New York: Barcelona, 1996.
39. N. Valkova, F. Lepine, L. Labrie, M. Dupont, R. Beaudet, *J.Biol.Chem.* 278 (2003) 12779.
40. U. Uysal, T. Guray, *J.Anal.Chem.* 63 (2008) 982.
41. L. Labat, E. Kummer, P. Dallet, J.P. Dubost, *J.Pharm.Biomed.Anal.* 23 (2000) 763.

Table 1. Analytical parameters for the MP-EP-PP-BP mixture

Parameter	MP		EP		PP		BP	
	Height	Area	Height	Area	Height	Area	Height	Area
b	76.64	479.25	49.00	473.70	7.96	443.77	11.46	68.04
S _b	25.77	129.55	17.51	135.60	6.04	199.81	3.74	39.32
a/M ⁻¹	9.28·10 ⁶	1.04·10 ⁸	6.26·10 ⁶	1.00·10 ⁸	7.61·10 ⁶	6.17·10 ⁷	4.19·10 ⁶	7.21·10 ⁷
S _a /M ⁻¹	1.83·10 ⁵	9.21·10 ⁵	1.24·10 ⁵	9.64·10 ⁵	1.28·10 ⁵	1.42·10 ⁶	7.98·10 ⁴	8.37·10 ⁵
R ² /%	99.38	99.87	99.37	99.85	99.63	99.16	99.53	99.82
LDR/M	9.85·10 ⁻⁷ to 3.28·10 ⁻⁴	9.85·10 ⁻⁷ to 3.28·10 ⁻⁴	9.02·10 ⁻⁷ to 3.28·10 ⁻⁴	9.02·10 ⁻⁷ to 3.28·10 ⁻⁴	8.32·10 ⁻⁷ to 9.86·10 ⁻⁵	8.32·10 ⁻⁷ to 9.86·10 ⁻⁵	7.72·10 ⁻⁷ to 9.86·10 ⁻⁵	7.72·10 ⁻⁷ to 9.86·10 ⁻⁵
LOD/M	1.91·10 ⁻⁸	9.19·10 ⁻⁹	2.83·10 ⁻⁸	9.56·10 ⁻⁹	2.33·10 ⁻⁸	1.55·10 ⁻⁸	4.22·10 ⁻⁸	1.33·10 ⁻⁸
LOQ/M	6.36·10 ⁻⁸	3.06·10 ⁻⁸	9.43·10 ⁻⁸	3.19·10 ⁻⁸	7.75·10 ⁻⁸	5.17·10 ⁻⁸	1.41·10 ⁻⁷	4.42·10 ⁻⁸
RSD [*] /%	5.56	4.19	3.49	5.38	4.22	8.70	6.22	9.25
RSD ^{**} /%	2.85	3.78	4.28	2.30	5.17	5.44	3.65	5.33

b Slope; S_b Standard Deviation of Slope; a Intercept; S_a Standard Deviation of Intercept; R Correlation Coefficient; LDR Limit Dynamic Range; LOD limit of detection; LOQ Limit of quantification; RSD^{*} Relative Standard deviation for 0.15 mg·l⁻¹ (low concentration) of parabens; RSD^{**} Relative Standard deviation for 15 mg·l⁻¹ of parabens (high concentration).

Table 2 Comparison of determination of paraben mixtures in cosmetics samples with different analytical techniques.

Method	Compounds	Range (M)	LOD (M)	Precision (%)	Application	Reference
Electrophoresis DAD detection	MP	$3.01 \cdot 10^{-6} - 4.89 \cdot 10^{-5}$	$2.14 \cdot 10^{-6}$	1.89	Cosmetics	[40]
	EP	$3.51 \cdot 10^{-6} - 5.69 \cdot 10^{-5}$	$1.75 \cdot 10^{-6}$	1.31		
	PP	$3.33 \cdot 10^{-6} - 5.41 \cdot 10^{-5}$	$1.42 \cdot 10^{-6}$	1.18		
	BP	$3.60 \cdot 10^{-6} - 5.84 \cdot 10^{-5}$	$2.86 \cdot 10^{-6}$	1.30		
HPLC DAD detection	MP	$6.57 \cdot 10^{-6} - 2.63 \cdot 10^{-4}$	$1.31 \cdot 10^{-7}$	1.5	Cosmetics	[41]
	EP	$6.01 \cdot 10^{-6} - 2.40 \cdot 10^{-4}$	$1.80 \cdot 10^{-7}$	3.2		
	PP	$5.55 \cdot 10^{-6} - 2.21 \cdot 10^{-4}$	$1.66 \cdot 10^{-7}$	2.5		
	BP	$5.14 \cdot 10^{-6} - 2.05 \cdot 10^{-4}$	$1.54 \cdot 10^{-7}$	2.4		
FIA mini-column DAD detection	MP	$3.17 \cdot 10^{-5} - 8.23 \cdot 10^{-4}$	$3.17 \cdot 10^{-5}$	1.4	Cosmetics	[23]
	EP	$3.84 \cdot 10^{-5} - 6.58 \cdot 10^{-4}$	$1.15 \cdot 10^{-5}$	2.7		
	PP	$5.77 \cdot 10^{-5} - 1.07 \cdot 10^{-3}$	$1.73 \cdot 10^{-5}$	2.6		
	BP	$1.12 \cdot 10^{-4} - 1.97 \cdot 10^{-3}$	$3.37 \cdot 10^{-5}$	3.5		
FIA (no separation) CL detection	MP	$2.95 \cdot 10^{-9} - 9.85 \cdot 10^{-7}$	$2.23 \cdot 10^{-9}$	1.1	Food	[17]
	EP	$1.81 \cdot 10^{-8} - 3.0 \cdot 10^{-6}$	$1.20 \cdot 10^{-8}$	1.2		
	PP	$2.77 \cdot 10^{-8} - 5.55 \cdot 10^{-6}$	$1.11 \cdot 10^{-8}$	1.6		
	BP	$4.12 \cdot 10^{-8} - 4.12 \cdot 10^{-6}$	$2.57 \cdot 10^{-8}$	1.7		
HPLC CL detection	MP	$2.62 \cdot 10^{-8} - 4.6 \cdot 10^{-5}$	$1.24 \cdot 10^{-8}$	2.6	Cosmetics	[26]
	EP	$3.00 \cdot 10^{-8} - 5.41 \cdot 10^{-5}$	$1.62 \cdot 10^{-8}$	2.2		
	PP	$3.32 \cdot 10^{-8} - 5.54 \cdot 10^{-5}$	$2.16 \cdot 10^{-8}$	1.9		
	BP	$3.08 \cdot 10^{-8} - 5.14 \cdot 10^{-5}$	$2.72 \cdot 10^{-8}$	1.7		
FIA mini-column CL detection	MP	$9.85 \cdot 10^{-7} - 3.28 \cdot 10^{-4}$	$1.91 \cdot 10^{-8}$	5.6	Cosmetics	This paper
	EP	$9.02 \cdot 10^{-7} - 3.28 \cdot 10^{-4}$	$2.83 \cdot 10^{-8}$	3.5		
	PP	$8.32 \cdot 10^{-7} - 9.86 \cdot 10^{-5}$	$2.33 \cdot 10^{-8}$	4.2		
	BP	$7.72 \cdot 10^{-7} - 9.86 \cdot 10^{-5}$	$4.22 \cdot 10^{-8}$	6.2		

Table 3. Recovery results obtained for the paraben mixtures in cosmetics

Compounds	Samples			
	Cleaning mousse		Cleaning towels	
	Spiked level mg·g ⁻¹	Recovery ^a %	Spiked level mg·g ⁻¹	Recovery ^a %
MP	0.22	111.4 ± 7.6	1.56	107.2 ± 2.8
EP	0.34	92.1 ± 8.5	0.48	83.3 ± 2.9
PP	0.20	104.5 ± 6.5	0.45	100.3 ± 3.8
BP	0.18	99.2 ± 4.3	---	---

^a Values are means for three determinations ± standard deviation.

Table 4. Results obtained for the paraben mixtures by reference and proposed methods.

Sample	MP/mg·g ⁻¹ ; R.S.D (%)			EP/mg·g ⁻¹ ; R.S.D (%)			PP/mg·g ⁻¹ ; R.S.D (%)			BP/mg·g ⁻¹ ; R.S.D (%)		
	Proposed method*	Reference method*	P _v [†] (%)	Proposed method*	Reference method*	P _v [†] (%)	Proposed method*	Reference method*	P _v [†] (%)	Propose method*	Reference method*	P _v [†] (%)
Cleaning mousse	0.64; 2.01	0.67; 0.14	5.0	0.143; 6.07	0.153; 0.47	15.5	0.213; 5.87	0.210; 0.45	68.9	0.194; 1.88	0.203; 0.51	6.7
Cleaning towels	0.730; 1.89	0.73; 1.81	97.4	0.210; 0.721	0.208; 0.32	71.9	0.20; 4.4	0.201; 0.24	5.0	---	---	---

*Mean of three determinations ± R.S.D. The data are expressed in mg of paraben per gram of product.

[†] P_v: P-value

Figure captions

Figure 1. FIA manifold for the separation of parabens with a mini-column and CL detection.

Figure 2. A) Retention time dependence on ACN percentage for different parabens. Each point is the average of three measurements. Conditions: carrier: ACN/water. Standards: diluted with the same carrier, $12.5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Flow rate: $1.4 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Loop volume: $150 \text{ }\mu\text{l}$. B) Dependence of retention time on carrier B composition. Conditions: carrier A: 12 % ACN/water, carrier B: ACN/water. Flow rate: $2.6 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Standards: diluted with the same carrier, $12.5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Loop volume: $150 \text{ }\mu\text{l}$. Bars represent the retention time of parabens and horizontal lines represent the peak broadness. Legend: \square MP \boxtimes EP \blacksquare PP \boxtimes BP

Figure 3. Variation of the CL emission signal with flow rate. Conditions: 10^{-2} M Ce (IV); 10^{-4} M Rho 6G; standards $2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (\blacklozenge MP, \blacksquare EP, \blacktriangle PP, \circ BP). The x-axis shows the total flow composed for the two pumps in the system.

Figure 4. Optimization of CL reagent concentration. A) H_2SO_4 concentration. Conditions: Ce (IV) 10^{-2} M ; Rho 6G 10^{-4} M ; loop volume $75 \text{ }\mu\text{l}$; B) loop volume. Conditions: Ce (IV) 10^{-2} M ; Rho 6G 10^{-4} M ; H_2SO_4 0.5 M ; C) Ce (IV) concentration. Conditions: Rho 6G 10^{-4} M ; H_2SO_4 2 M ; loop volume $75 \text{ }\mu\text{l}$; D) Rho 6G concentration. Conditions: Ce (IV) $2\cdot 10^{-2} \text{ M}$; H_2SO_4 2 M ; loop volume $75 \text{ }\mu\text{l}$. In all cases we used a mixture of $2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ for each paraben (\blacklozenge MP, \blacksquare EP, \blacktriangle PP, \circ BP). Bars represent the repeatability of CL signals (three replicates per point).

Figure 5. Manifold used to discuss the CL mechanism: A) Dependence of CL signal with distance from injection valve to T connector; B) Dependence of CL signal distance from T connector to luminometer; C) CL record from solutions containing $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ in each parabens injected separately. Conditions: Ce (IV) $2\cdot 10^{-2} \text{ M}$, Rho 6G $4\cdot 10^{-4} \text{ M}$, 2 M of sulphuric acid and $75 \text{ }\mu\text{l}$ of loop volume at a flow rate of $2.5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$.

Figure 6. CL record for standards and samples (cleaning mousse and cleaning towels).

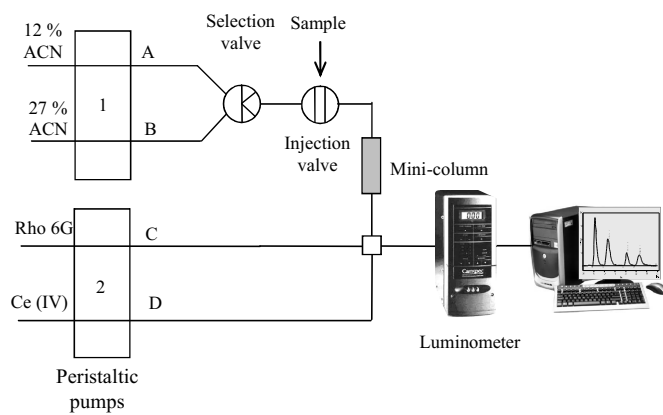


Figure 1

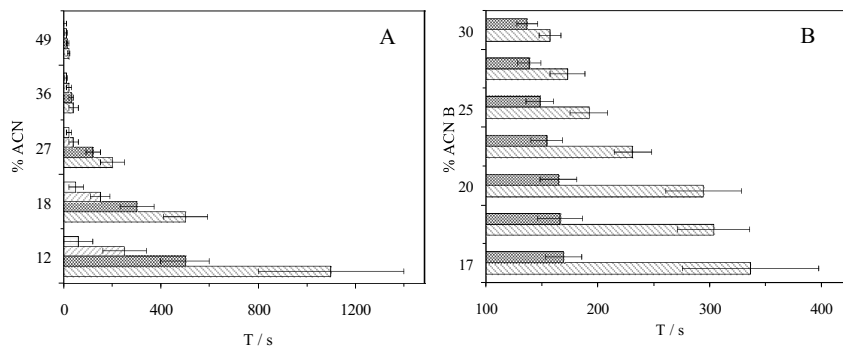


Figure 2

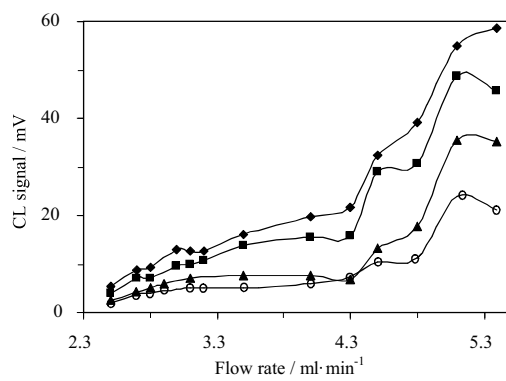


Figure 3

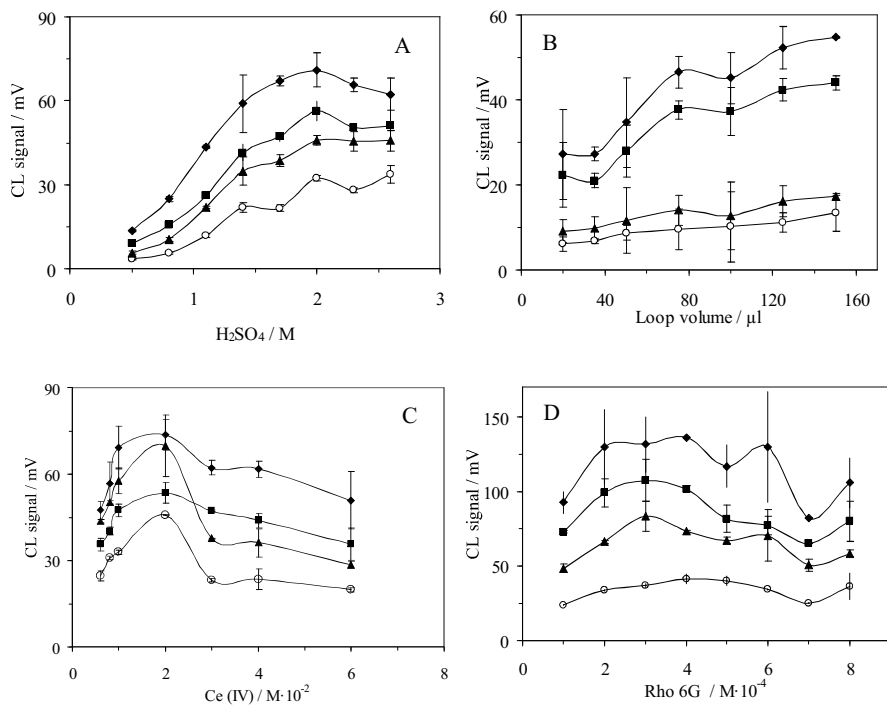


Figure 4

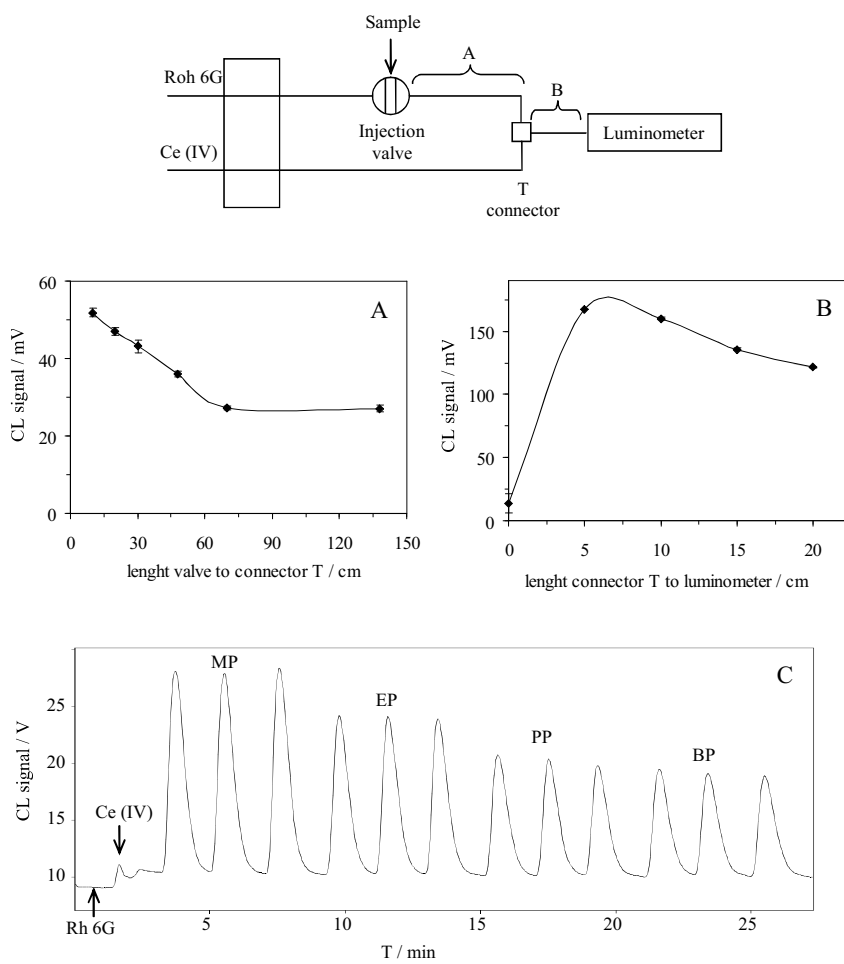


Figure 5

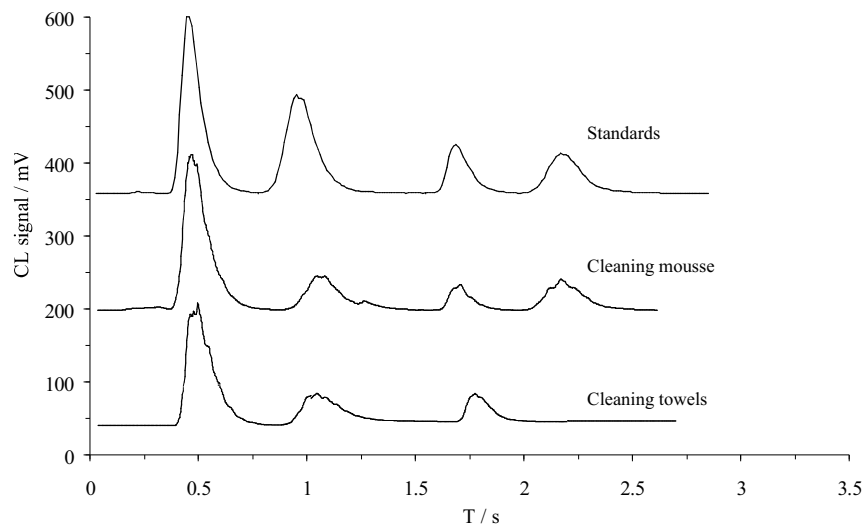


Figure 6

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

**ANALYSIS OF PHENOLIC COMPOUNDS IN HEALTH CARE PRODUCTS
BY LOW-PRESSURE LIQUID-CHROMATOGRAPHY WITH MONOLITHIC
COLUMN AND CHEMILUMINESCENT DETECTION**

*J. Ballesta Claver, M.C. Valencia-Miron and L.F. Capitán-Vallvey**

Solid Phase Spectrometry Research Group, Department of Analytical Chemistry,

Campus Fuentenueva, Faculty of Sciences, University of Granada,

E-18071 Granada, Spain.

Abstract

This paper presents a new application for monolithic columns with low pressure chromatographic separation using an FIA configuration with chemiluminescent detection for the determination of a mixture of phenolic compounds: phloroglucinol (PH), 2,4-dihydroxybenzoic acid (DHBA), salicylic acid (SA), methyl paraben (MP) and n-propyl gallate (PG). The procedure consists of the separation of these compounds on a reverse phase ultra-short monolithic column with pH 3.0 acetate buffer with 5% acetonitrile as carrier phase. The detection is based on a chemiluminescence measurement coming from Ce(IV)-Rhodamine 6G chemistry with the incorporation of two different chemiluminescent chemical conditions in the chromatographic setup in order to enhance the sensitivity for the different phenolic compounds. All separation and detection variables were optimized to propose a determination method. The analysis is performed in 280 s, with the sampling frequency being some 13 h⁻¹. The calibration function is a double reciprocal function obtaining good results within two orders of magnitude. The limits of detection (LOD) were: 8.80·10⁻⁸ M (PH); 2.70·10⁻⁸ M (DHBA); 2.30·10⁻⁸ M (SA); 5.15·10⁻⁸ M (MP) and 4.08·10⁻⁶ M (PG) and the relative standard deviation (RSD) at a medium concentration, 2 mg·l⁻¹, were: 4.43 % (PH); 2.75 % (DHBA); 5.16 % (SA);

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

3.61 % (MP) and 6.83 % (PG). The method was applied and validated satisfactorily for the determination of these compounds in health care products, comparing the results against an HPLC reference method.

Keywords. Health care products; Monolithic mini-column; Low-presure chromatographic separation; Chemiluminescence; Ce(IV)-Rhodamine 6G chemistry.

* Corresponding author. E-mail: lcapitan@ugr.es (L.F. Capitan-Vallvey).

1. INTRODUCTION

One of the most analyzed chemical groups is phenolic compounds (PCs) due to their involvement in health questions and their physiological, chemical and anti-carcinogenic properties. They are produced naturally –in foods and in human and animal wastes and in the decomposition of organic material– but can also be man-made chemicals used in many different applications [1]. These compounds, characterized by at least one aryl ring with at least one attached hydroxyl group, are widely used as preservatives and in medicinal preparations because of their broad antimicrobial spectrum. They may be harmful to consumers due to their tendency to induce allergic contact dermatitis. Hence, the determination of these compounds in different commercial products is important both for quality assurance and consumer safety.

The most convenient and often used techniques for the determination of phenolic compounds include gas chromatography [2], high-performance liquid chromatography [3,4], and capillary electrophoresis [5].

The marriage of chromatography to flow techniques offers interesting characteristics, because flow technique methods present advantages in simplicity, low cost, versatility, speed, and, typically, good analytical figures, although without separation abilities. For its part, liquid chromatography is a well-established analytical technique with high separative power, selectivity and performance, but it requires much more expensive instrumentation than flow techniques. This justifies the combination of flow techniques, such as flow injection analysis (FIA) [6], or sequential injection analysis (SIA) [7] with low pressure chromatographic separations to achieve selective low-cost analytical methodology.

The key to this combination of flow techniques and chromatographic separations are monolithic materials, a high cross-linked porous monolithic polymer with mesopores

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

for retention and larger macropores for through-flow that provide good separation power, high chemical stability and flow characteristics at low pressure conditions [8].

Different flow techniques and monolithic materials have been used in combination mainly with DAD or conductivity detection for separations of drug mixtures [6,7,9,10], food and cosmetics additives [11,12], pollutants such as polyaromatic hydrocarbons [13] and inorganic cations and anions mixtures [8,14,15].

Chemiluminescence (CL) is a widely used detection method for different techniques such as HPLC, capillary electrophoresis, thin layer chromatography and FIA [16] due to the high sensitivity and wide linear range attainable with simple instrumentation [17].

Different types of CL detection have been used in FIA schemes, although without any separation steps, for the determination of phenolic compounds. For example, Haghghi and Dadashvand [18] have proposed the N-chlorosuccinimide-KI-luminol chemistry; Costin *et al.* [19] used a FIA with CL detection using acidic permanganate for the estimation of the total phenolic content in wine with CL; and Cui *et al.* proposed the CL coming from a Ce(IV) and Rhodamine 6G reaction for the determination of different phenolic compounds [17]. Therefore, the combination of HPLC and CL detection offers an improvement over conventional HPLC methods for phenolic compounds [20,21].

CL detection has rarely been used in low pressure chromatographic systems with a monolithic column using FIA manifolds. Thus, Adcock *et al.* [6] proposed a hybrid FIA/HPLC system for the separation of six alkaloids and four biogenic amines using a 25 mm length monolithic column with tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(III) and permanganate CL detection. Paull *et al.* [22] used a 3 mm long chelating monolithic disk for the selective retention and CL determination of Cu(II) based on 1,10-phenanthroline and hydrogen peroxide chemistry. We have described the separation of parabens in cosmet-

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
ics using an ultra-short monolithic column and CL detection based on Ce(IV)-Rhodamine 6G chemistry in a simple FIA manifold [23].

In this paper we are interested in the use of CL detection in low pressure chromatographic separations using an FIA system that includes an ultra-short monolithic column, due to its good detection limits and versatility, in order to improve the characteristics of these methods. We selected the phenolic compounds commonly used in formulations of health care products such as phloroglucinol (PH), 2,4-dihydroxybenzoic acid (DHBA), salicylic acid (SA), methyl paraben (MP) and n-propyl gallate (PG), to verify and propose a simple and cheaper analytical solution for these compounds.

2. EXPERIMENTAL

2.1. Reagents and Chemicals

All chemicals used were of analytical reagent grade. Aqueous solutions were prepared using reverse-osmosis type quality water produced by a Milli-RO 12 plus Milli-Q purification system (Millipore, Bedford, MA, USA). Phloroglucinol (PH), 2,4-dihydroxybenzoic acid (DHBA), salicylic acid (SA), methyl paraben (MP) and n-propyl gallate (PG) are supplied by Sigma (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, Spain). 100 mg·l⁻¹ stock solutions containing each phenolic compound (PC) and a solution containing all phenolic compounds (PCs) at 100 mg·l⁻¹ each, were prepared by exact weighing of each compound and solution in 5 % (v/v) acetonitrile (ACN) (Panreac Química S.A, Barcelona, Spain, 99.9 % v/v HPLC grade). These solutions were spectrophotometrically stable when protected from light and kept in the refrigerator at 4°C at least for two months. Other solutions were prepared by appropriate dilutions with water while maintaining 5 % (v/v) ACN in all instances. The pH 3.0 buffer acetate 2 M was prepared from acetic acid 96 % (p/v) (d = 1.052 g·ml⁻¹) by Panreac and NaOH 0.5 M. The chemiluminescent

1 reagents used were 10^{-2} M ammonium cerium (IV) sulfate dihydrate (99 %) and 1 M
2 sulfuric acid, both by Merck (Madrid, Spain) and 10^{-3} M of Rhodamine 6G chloride
3
4 (Rho 6G) 95 % by Sigma.
5
6
7
8

9 **2.2. Apparatus and Software**

10 The flow analysis set-up consisted of two Gilson Minipuls-2 four channel peristaltic
11 pumps (Gilson, Inc., Middleton, USA) working at a constant flow-rate and four variable
12 volume Rheodyne 5041 teflon rotary valves (one as injection valve and the other three
13 as selection valves) controlled electromechanically by a homemade device. PTFE tub-
14 ing (Omnifit, Cambridge, England) (0.8 mm i.d. and 1.6 mm o.d.) and various end-
15 fittings and connectors of different diameters were used. As the separation element in
16 the flow system we tested a C_{18} monolithic mini-column (Chromolith Guard Cartridge
17 RP-18 endcapped) (5 mm×4.6 mm i.d.) from Merck (Darmstadt, Germany) and an ani-
18 onic precolumn CIM from Bia Separations (Ljubljana, Slovenia). With these monolithic
19 mini-columns we were able to use low-pressure pumps (peristaltic pumps in this case).
20 Additionally, the system back pressure was minimized using tubing with 0.8 mm i.d.
21 with the maximum flow rate attained being $2.6 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$.
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40

41 Chemiluminescence measurements were performed with a CL-1 Camspec luminometer
42 (Camspec Ltd., Cambridge, UK) interfaced to a personal computer via an INT7 - 24 bit
43 A/D integration board. Peristaltic pumps, rotary valves and the luminometer were con-
44 nected to PC and controlled by software designed by us.
45
46
47
48
49

50 Other instruments used were a Hewlett Packard HP-8453 diode array spectrophotometer
51 (Nortwalk, CT, USA) interfaced to a PC and equipped with a Hellma 138-QS flow cell
52 with 1 mm light path; an Agilent 1100 series liquid chromatograph with DAD detector
53 provided with a C_8 Zorbax column used to validate the proposed method, and a Crison
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2 digital pH-meter with combined glass-saturated calomel electrode (Crison Instruments,
3 Barcelona, Spain). For sample extraction, C₁₈ Isolute solid phase extraction cartridges
4 (Biotage AB, Uppsala, Sweden) were used.
5
6

7 Software programs used for the treatment of the data were: CSW32 software package
8 supplied by DataApex Ltd. v 1.2.5 (2001) (Prague, Czech Republic) used for the acqui-
9 sition and manipulation of the luminescence data; Statgraphics software package (Ma-
10 nugistics Inc. and Statistical Graphics Corporation, USA, 1992), ver.4.0 (1993) and Mi-
11 crosoft Office 2003.
12
13
14
15
16
17
18

19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Figure 1

2.3. Procedure

2.3.1. Standards and samples

A sample solution or standard containing between 10^{-7} and 10^{-4} M each of PH, DHBA, SA, MP and PG with the same composition as the carrier A was inserted into the flow analysis system through a loop valve injector (150 μ l). For the mobile phase we used two: pH 3.0 acetate buffer 0.1 M (carrier A) and 0.1 M pH 3.0 acetate buffer with 5% ACN:H₂O v/v (carrier B) working in both cases at a flow rate of 2.6 ml·min⁻¹. The CL detection is based on Ce(IV) and Rhodamine 6G chemistry and two different configurations were used: 1) $6 \cdot 10^{-2}$ M Ce(IV) in 0.5 M H₂SO₄ (solution C) and $5 \cdot 10^{-5}$ M Rho 6G (solution E); and 2) $2 \cdot 10^{-2}$ M Ce(IV) in 1.5 M H₂SO₄ (solution D) and $5 \cdot 10^{-4}$ M Rho 6G (solution F). These solutions were moved by a second peristaltic pump at a flow rate of 2.6 ml·min⁻¹.

Initially, the carrier A flowed through the manifold and was mixed with solutions C and E using a 4-ways connector. 150 s after the injection valve was opened, the carrier changes to carrier B and at the same time solutions C and E changed to solutions D and

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

F using a programmed sequence for the three needed selection valves. The CL analytical signal corresponded to the difference between the maximum CL intensity (I_1) and CL background (I_0). The relationship between the concentration and peak height for phenolic compounds was established by conventional calibration with external standards.

2.3.2. Reference

As reference method, an adaptation of the HPLC-DAD method proposed by Mikami *et al.* [24] was used. A 5 μm C₈ silica in a 150 x 4.6 mm column along with an isocratic mobile phase made up of water:acetic acid (95:5) at a constant flow rate of 1.0 ml·min⁻¹ were used and the chromatograms were obtained at the wavelengths: 260 nm (PH), 254 nm (DHBA), 300 nm (SA), 254 nm (MP) and 272 nm (PG). To obtain the calibration function, 5 different concentrations and 3 replicates each of the standard solution were analyzed using peak height as the analytical parameter.

2.3.3. Maintenance

For correct maintenance of the system, especially the mini-column, before the analysis it was necessary to pass 10 % ACN:H₂O (v/v) at a flow rate of 2.0 ml·min⁻¹ for 5 min to clean and then carrier A for another 5 min to condition the mini-column. Once the last peak arrived at the baseline, which occurs 280 s after the injection valve was opened, the flow system was conditioned with carrier A for 30 s. After use and to improve the lifetime of the mini-column, the flow system was washed by carrier A first for 5 min and then with water for another 5 min.

2.4. Sample preparation

For the analysis of the cleaning gel and callus corrector cream we used an adaptation of the sample treatment proposed by Mikami *et al.* [24]. An adequate amount of gel or

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

cream (typically 1 g) was weighed in a 50 ml round flask and roto-evaporated for 30 min at 90 °C to eliminate water. Then 5 ml of ethyl acetate was added, shaking in an ultrasonic bath for 5 min and then adding 25 ml of hexane. Then, the sample was purified using a C₁₈ SPE cartridge activated with 10 ml of hexane:ethyl acetate solution (4:1). Afterwards, 2 ml of the previous solution of sample was passed through the activated cartridge and without any further washing step was eluted with hexane:ethyl acetate (4:1). After evaporation of the solvent in a roto-evaporator for 5 min, the extract was dissolved in 5 ml of ACN and 20 ml of water. Each sample was analyzed in triplicate, measuring them three times for peak height.

3. RESULTS AND DISCUSSION

In previous papers, we studied the feasibility of separating different additives such as parabens [11] and mixtures of antioxidants, preservatives and sweeteners [12] using low-pressure chromatographic separation by a monolithic mini-column included in a flow system with UV detection. Additionally, detection based on chemiluminescence offers advantages in sensitivity and limits of detection. In this paper, we studied the separation of five phenolic compounds widely used as health care products by means of an ultra-short monolithic column combined with CL detection to improve lineal ranges and limits of detection.

The chromatographic separation step was studied and optimized first using a simple spectrophotometric detection, and then we studied the post-column CL detection, adjusting the different influencing factors and considering the influence of separation conditions on this CL detection.

3.1. Chromatographic separation

1 We studied two different mechanisms for the separation of these phenolic compounds,
2 first an ion-exchange-based one using an anionic disk as the separative element and a
3 polarity-based one using a C₁₈ mini-column second. Different preliminary studies with
4 anion-exchange disks working at pH between 7 and 9 only permit the separation of SA
5 and DHBA from the others analytes due to their small differences in pK_a values (PH:
6 8.45 [25] and 8.88 [26]; DHBA: 3.12 and 8.82 [27]; SA: 2.98 [28] and 13.62 [29]; MP:
7 8.4 [30] and PG: 7.79 and 10.9 [31]) and the short length of column used.

8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

When considering the differences in polarity of the phenolic compounds under study,
measured as octanol-water partition coefficients (log P), we found that at a pH around 3,
the differences are high enough for separation (PH log P: 0.16 [32], DHBA 1.63 [33],
SA 1.68 [34], MP 1.91 [35] and PG 1.80 [36]).

To verify this separation, we used a C₁₈ silica-based mini-column working in different
pH conditions (2-7) in the aqueous carrier (phosphate buffer, acetate buffer and hy-
drochloric acid). A pH of 3 or lower makes it possible to separate PH, DHBA and SA,
due to the fact that the increased suppression of the dissociation of more acidic phenols,
such as DHBA and SA, increases the retention time (Figure 2A). Consequently, we se-
lected pH 3.0 acetate buffer 0.1 M as carrier, although in those conditions the analysis
time, due to the high retention of MP and PG, is too long (480 s). To reduce the analysis
time, we decreased the polarity of the carrier with ACN. Figure 2B shows a decrease in
the analysis time with the ACN percentage, with 5% being the best choice for a good
resolution (R_s >1.2). Since the resolution for PH, DHBA and SA in 5% ACN is lower
than 0.8 (DHBA and SA overlapping) we began the run with pH 3 acetate buffer 0.1 M
and after the separation of PH, DHBA and SA we changed the carrier to 5 % ACN- pH
3 acetate buffer 0.1 M, decreasing the analysis time to 280 s. Although we studied mini-

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

columns of different lengths (5 and 10 mm), we selected a 5 mm column because in the above working conditions, it provides sufficiently good resolution of these analytes.

Figure 2

We then studied the influence of separation conditions on chemiluminescent detection. The presence of ACN in the carrier composition decreases the CL emission. For instance, 15 % of ACN in the carrier produces a reduction of some 15.3 % in CL emission, behaviour described by Gil Garcia *et al.* [37]. However a smaller ACN percentage, such as the 5 % ACN-acetate buffer used here, has a minimum effect on the CL signal (1.3 %).

3.1.1. Separation flow rate

To study the flow rate working in the optimum separation conditions, we tested five values between 0.8 and 2.6 ml·min⁻¹. Figure 3 shows that the best separation considering bandwidth and resolution corresponds to 2.6 ml·min⁻¹.

Figure 3

3.1.2. Separation conditions

We performed the separation of phenolic compounds using two carriers: pH 3 acetate buffer (carrier A) and 5 % (v/v) of ACN-pH 3 acetate buffer (carrier B). The change from carrier A to B using an automatized selection valve occurs at 150 seconds, once the PH, DHBA and SA leave the column (first part of chromatographic record). Subsequent to this change in carrier, we separated MP and PG (second part of chromatographic record). The elution sequence, with a resolution greater than 1.2 in all cases, is: PH (24 s); DHBA (56 s); SA (105 s); MP (185 s); PG (250 s), with a total analysis time of 280 s (Figure 5A).

3.2. Chemiluminescent detection

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

The detection of phenolic compounds by chemiluminescence requires the selection of CL reagents and the adjustment of CL conditions. Different CL reactions for determination of PCs have been proposed, including luminol [38], peroxyoxalate [5] and Ce(IV) [21]. We chose Ce(IV) chemistry due to its versatility, selectivity and stability for PC detection. This reagent is generally used in the presence of different enhancers to increase the CL signal, such as Tween 20 [21], Rho 6G [17], fluorescein, sulfite or quinine [39]. We studied all these enhancers along with Ce(IV), observing that the use of quinine, sulfite and fluorescein does not produce any CL signal. The results for the others, Rho 6G, Tween 20 and the mixture of both, is presented in Table 1. Better results were obtained for Rho 6G, whereas Tween 20 considerably reduced the CL emission and the combined use of Rho 6G and Tween 20 [39] did not offer any substantial improvement.

Table 1

The optimization of the CL detection was performed studying univariantly the chemical conditions for the different PCs under study, i.e., selecting a compromise values from the results obtained. The CL reaction and chromatographic separation were carried out in separated flow lines (Figure 1), because the use of a single line results in a saturation of the mini-column by Rho 6G which decreases the efficiency of the separation.

3.2.1. Total flow rate.

The CL emission increases continuously with the total flow rate attained with the two peristaltic pumps. For this reason, we chose the maximum flow rate reachable by the second peristaltic pump, $2.6 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, obtaining a total flow rate of $5.2 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$.

3.2.2. Cerium(IV) concentration

The effects of Ce(IV) on the CL signals coming from PCs were examined between $6\cdot 10^{-4} \text{ M}$ and $6\cdot 10^{-2} \text{ M}$ in $1.5 \text{ M H}_2\text{SO}_4$ and $4\cdot 10^{-4} \text{ M}$ Rho 6G. As seen in Figure 4A, the

1 maximum CL signals for the PCs studied occurred at a different Ce(IV) concentration:
2 for PH, DHBA and SA at $6 \cdot 10^{-2}$ M, and for MP and PG at $2 \cdot 10^{-2}$ M. In all cases, except
3
4 for MP, the signal increases with the concentration up to a plateau. In the case of MP, a
5
6 maximum is observed with the CL then decreasing. This CL behaviour is due to the fact
7
8 that an increase in Ce(IV) concentration increases the reaction rate and the maximum of
9
10 the reaction occurs before the bolus reaches the luminometer [23,40]. The MP and PG
11
12 CL mechanism is different from the others because of their need of prior hydrolysis,
13
14 having a different behaviour (see CL mechanism).
15
16
17
18
19
20

Figure 4

21 3.2.3. H₂SO₄ concentration

22 The CL reaction based on Ce(IV) requires strong acidic conditions with H₂SO₄ [41].
23
24 Nine different H₂SO₄ concentrations between 0.2 and 2.6 M were studied for CL gener-
25
26 eration with PCs (Figure 4B), working at the optimum Ce(IV) condition for each. It was
27
28 observed that the best conditions are not the same for all the compounds: 0.5 M for PH,
29
30 SA and PG and 1.5 M for DHBA and MP. The reason for the CL decrease with the in-
31
32 crease in acidity is due to the precipitation of Ce(IV) sulfate at higher H₂SO₄ concentra-
33
34 tions. Creager *et al.* [42] described that the maximum concentration of Ce(IV) in solu-
35
36 tion corresponds to 0.5 M in H₂SO₄, which agrees with our results for PH, SA and PG.
37
38 However, MP increases the CL signal with acid concentration because of the increasing
39
40 hydrolysis with acidity according to CL mechanism.
41
42
43
44
45
46
47

48 3.2.4. Rhodamine 6G concentration

49 The influence of Rho 6G showed a similar pattern for all the PCs studied (Figure 4C)
50
51 but the maximum was reached at different concentrations: PH and MP ($5 \cdot 10^{-4}$ M); SA
52
53 ($5 \cdot 10^{-5}$ M) and PG and DHBA ($8 \cdot 10^{-4}$ M). When the concentration of Rho 6G increases,
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

the CL emission decreases slowly due to the formation of nonfluorescent dimers of Rho 6G which act as an efficient quencher of the monomer [43].

As a result of the above study of the influence of Ce(IV), H₂SO₄ and Rho 6G, the working conditions must be different, which implies a cumbersome procedural system. In order to select the best compromise conditions, we included two sets of concentrations in the two separation conditions used. In the first part of chromatographic separation (PH, DHBA and SA), we considered that SA must work at its best chemical conditions (0.5 M H₂SO₄, 6·10⁻² M Ce(IV) and 5·10⁻⁵ M of Rho 6G) due to the low CL emission. This choice produced CL that decreased in intensity 27 % for PH and 50% for DHBA. In the second part of the chromatographic separation (MP and PG), the selection of 0.5 M H₂SO₄, which is the optimum for PG due to the low CL intensity, means a dramatic CL decrease for MP. Thus, the concentrations were fixed at the best conditions for MP, i.e. 1.5 M H₂SO₄, 2·10⁻² M Ce(IV) and 5·10⁻⁴ M of Rho 6G (Figure 5A). This choice produces a CL signal the decreases 60 % for PG but in these conditions, it is possible to determine these two analytes with the required sensitivity.

3.2.5. Loop volume

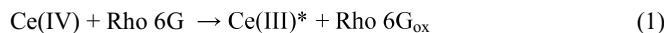
We studied loops of different lengths, thus with different volumes, from 25 to 500 µl. The pair resolutions Rs decreased slightly from 25 to 150 µl (PG-DHBA 2.4 to 1.6, DHBA-SA 2.5 to 2.0, SA-MP 3.9 to 3.6, MP-PG 2.7 to 2.5). From 150 to 300 µl, the Rs decreased considerably, especially in the first part of chromatographic separation (PG-DHBA 1.6 to 0.8, DHBA-SA 2.0 to 1.1, SA-MP 3.6 to 4.1, MP-PG 2.5-2.7), resulting in a strong overlap for PG-DHBA-SA. On the other hand, the CL signal increased from 25 to 150 µl for all the PCs, but from 150 to 500 µl it decreased, except with MP, which continued to grow. Due to the good resolution for all the peaks, we decided to select 150 µl as the loop volume.

3.2.6. Ionic strength

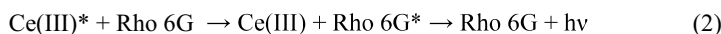
Ionic strength was studied by adding different amounts of NaCl to the carrier (up to 0.25 M), which had, as is to be expected with these analytes, no influence on the retention times. Consequently, no salt was added to the carrier.

3.3. Chemiluminescence mechanism.

The mechanism of the CL generation for phenolic compounds using the Ce(IV)-Rho 6G reaction has been studied by different authors [17,21,44,45]. Basically, when Ce(IV) reacts with Rho 6G, a small chemiluminescent emission occurs, due to the redox reaction:



The Rho 6G_{ox} is non fluorescent [46] and the Ce(III) is in excited state. This Ce(III)* returns to its fundamental state with a small CL emission, but in the presence of fluorophore Rho 6G transfers its energy, emitting fluorescence [17].



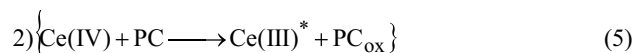
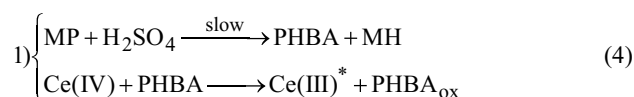
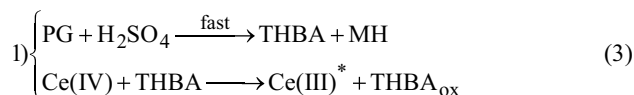
In this work, we had two types of analytes: phenolic ester compounds (MP and PG) and phenolic compounds (PH, DHBA and SA).

1) MP and PG were hydrolyzed in acid medium producing the p-hydroxybenzoic acid (PHBA) or 3,4,5-trihydroxybenzoic acid (THBA) and the corresponding alcohol, respectively. The PHBA or THBA produced is easily oxidized by Ce(IV) producing Ce(III)* as described by Hua Cui *et al.* [45], giving the corresponding oxidation products PHBA_{ox} or THBA_{ox}. This Ce(III)* in the presence of Rho 6G gives rise to a more intense emission because of the efficient Ce(III)* production [47]. Making an estimation of the acidic hydrolysis constant using the SPARC program [48] we obtained $2.42 \cdot 10^{-7} \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ for MP and $2.3 \cdot 10^{-3} \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ for PG, i.e. the hydrolysis for PG was

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

faster than MP. This agrees with the H₂SO₄ optimization results (Figure 4B) where the PG was completely hydrolyzed at 0.5 M H₂SO₄ and the MP required more acidic conditions to be hydrolyzed. On the other hand, the CL emission of PHBA was higher than THBA, which agrees with the results by Cui et al. [17] and with the half-peak oxidation potentials ($E_{1/2}$) since PHBA is a more reducer chemical (0.64 V) than THBA (0.01 V) [49]. The decrease in the THBA CL emission was due to the formation of a Ce(IV) complex ($K_f = 3.24 \cdot 10^{-2} \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1}$) through the two hydroxyl groups of THBA [50].

2) PH, DHBA and SA were oxidised by Ce(IV) at first. The Ce(III)* produced engendered a CL emission in the presence of Rho 6G [47], although depending on the distribution of the hydroxyl groups in the molecule, different intensity in the CL signals was obtained [17]. This agrees with the reducing characteristics of the molecules ($E_{1/2}$): DHBA (0.68 V) > PH (0.52 V) > SA (0.48 V) [51]. In brief, the CL emissions for the different PCs are:



3.4. Analytical parameters

As usual with CL methods, and because of its better analytical features, we used analytical parameter peak height for PC analysis. The calibration function for all PCs studied was linearised, applying a double reciprocal function: $1/I = a \cdot 1/X + b$ that was obtained using three replicates of each standard and nine standards for each calibration graph. The lack-of-fit test was applied to check its linearity.

Table 2

1
2 Table 2 presents the analytical parameters obtained for the phenolic compounds studied.
3
4 As the calibration function is a double reciprocal, the limit of detection (LOD) and the
5
6 limit of quantification (LOQ) were obtained using the standard criteria [52]. $LOD = y_b +$
7
8 $3s_b$ and $LOQ = y_b + 10s_b$, where y_b is the average blank signal and s_b is the standard
9
10 deviation of ten blanks. The analytical parameters show that PG has lower accuracy and
11
12 sensitivity due to its lower CL signal. The sampling frequency was some 13 h^{-1} . The
13
14 proposed method shows satisfactory results for the quantification of each PC in the
15
16 presence of different ratios of the co-existing PCs (1:5 to 5:1) without any interference
17
18 in CL signals or loss in resolution ($R_s > 1.5$ in all cases).
19
20

21
22 Comparing the analytical characteristics of this low pressure technique with HPLC using
23
24 CL detection for phenolic compounds analysis [44], we found a higher lineal range
25
26 for the HPLC method (one order of magnitude), similar values of LOD, shorter reten-
27
28 tion times for the low pressure technique (PH 0.4 min; DHBA 0.9 min; SA 1.75 min;
29
30 MP 3.1 min; PG 4.2min) with respect to HPLC (PH 2.4 min; DHBA 12.0 min; SA 29.1
31
32 min; MP 9.7 min; PG 2.7 min) and better precision for HPLC (1.3-4.4 %) than this low
33
34 pressure technique (2.7-6.8 %). However, the configuration presented in this work of-
35
36 fers a good resolution for small groups of PCs with short analysis time, economic in-
37
38 strumentation and good detection limits.
39
40
41
42
43
44
45
46
47

48 **3.5. Analytical applications**

49
50 The proposed method was applied to the analysis of health care products, specifically to
51
52 a cleaning gel and a callus corrector cream, which contain two of the five phenolic
53
54 compounds studied in the text, SA and MP (Figure 5B). MP and SA are used as preser-
55
56 vatives in food, cosmetics solvent products, paste, glue and hides [53] and salicylic acid
57
58
59
60
61
62
63
64
65

has been used recently as a whitening agent in cosmetics and as exfoliation agent in skin care creams [54].

Figure 5

For the extraction of PCs in the health care products studied, we used an adaptation of the sample treatment proposed by Mikami *et al.* [24]. The quantitativensness of the extraction procedures was tested through the addition of known amounts of each PC. Recoveries of the different PCs, measured in triplicate, ranged from 93.1 to 110.2 %.

Table 3 shows the results obtained using the proposed and an HPLC reference procedure. This table includes the mean values from 3 determinations of each sample, standard deviations of these measurements and the probability value (P_{val}) of the test used for the comparison of the results obtained for both methods.

As can be seen, the precision of the HPLC reference method is higher than the proposed low pressure chromatographic CL method, but the latter uses very simple, fast instrumentation that is cheaper and has better detection limits. The drawbacks of this method are its lower precision and limited capacity for separation due to the column length, although it is sufficient for the determination of these analytes.

Table 3

4. CONCLUSION

We have succeeded in the determination of a mixture of five phenolic compounds – PH, DHBA, SA, MP and PG – using a low pressure chromatographic system with an ultra short monolithic column (5 mm) with chemiluminescent detection.

One of the usual problems with CL detection for separative techniques is the selection of CL conditions. Here, the use of two different chemical conditions, based on Ce(IV)-Rhodamine 6G chemistry, for: 1) PH, DHBA and SA; and 2) MP and PG, both implemented in the flow manifold, improve the sensitivity of the CL system. The results were

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

chemometrically validated and compared with an HPLC reference method for the analysis of health care products. The described method is practical, simple, rapid, easy to maintain and inexpensive and can determine phenolic compounds at $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. The repeatability values (% RSD) fluctuate for medium levels between 2-6 %. The incorporation of electromechanically controlled rotary valves with a programmed sequence facilitates their use in routine analysis.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

We acknowledge financial support from *Ministerio de Educación y Ciencia, Dirección General de Enseñanza Superior* (Spain) (Projects CTQ2005-09060-CO2-01, CTQ2005-09060-CO2-02 and P06-FQM-01467).

REFERENCES

1. M. Ahmaruzzaman, *Adv. Colloid Interface Sci.* 143 (2008) 48.
2. T. Serot, C. Lafficher, *Food Chem.* 82 (2003) 513.
3. A. Escarpa, M.C. Gonzalez, *Anal. Chim. Acta* 427 (2001) 119.
4. Terashima, C.; Fujishima, A. *Comprehensive Analytical Chemistry*, Alegret, S.; Merkoçi, A., Eds.; 2007; Chapter 11.
5. K. Tsukagoshi, T. Kameda, M. Yamamoto, R. Nakajima, *J. Chromatog. A* 978 (2002) 213.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

6. J.L. Adcock, P.S. Francis, K.M. Agg, G.D. Marshall, N.W. Barnett,
Anal.Chim.Acta 600 (2007) 136.

7. P. Chocholous, D. Satinsky, P. Solich, Talanta 70 (2006) 408.

8. S. Pelletier, C.A. Lucy, J.Chromatog.A 1118 (2006) 12.

9. H.M. Gonzalez-San Miguel, J.M. Alpizar-Lorenzo, V. Cerda-Martin, Talanta 72
(2007) 296.

10. J. Klimundova, D. Satinsky, H. Sklenarova, P. Solich, Talanta 69 (2006) 730.

11. J.F. Garcia-Jimenez, M.C. Valencia-Miron, L.F. Capitan-Vallvey, J.Anal.Chem.
In press (2008) .

12. J.F. Garcia-Jimenez, M.C. Valencia, L.F. Capitan-Vallvey, Anal.Chim.Acta 594
(2007) 226.

13. P.N. Nesterenko, M.A. Rybalko, Dokl.Chem. 404 (2005) 178.

14. B. Paull, C.O. Riordain, P.N. Nesterenko, Chem.Comm. (2005) 215.

15. D. Connolly, D. Victory, B. Paull, J.Sep.Sci. 27 (2004) 912.

16. A.M. Garcia Campaña, F.J. Lara, Anal.Bioanal.Chem. 387 (2007) 165.

17. H. Cui, Q. Zhang, A. Myint, X. Ge, L. Liu, J.Photochem.Photobiol., A 181 (2006)
238.

18. B. Haghghi, R. Dadashvand, Anal.Bioanal.Chem. 384 (2006) 1246.

19. J.W. Costin, N.W. Barnett, S.W. Lewis, D.J. McGillivray, Anal.Chim.Acta 499
(2003) 47.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

20. Q. Zhang, H. Cui, A. Myint, M. Lian, L. Liu, *J.Chromatog.A* 1095 (2005) 94.
21. H. Cui, J. Zhou, F. Xu, C.Z. Lai, G.H. Wan, *Anal.Chim.Acta* 511 (2004) 273.
22. E. Tyrrell, P.N. Nesterenko, B. Paull, *J.Liquid Chromatog.Rel.Tech.* 29 (2006) 2201.
23. J. Ballesta-Claver, M.C. Valencia-Miron, L.F. Capitan-Vallvey, *Talanta* In press (2008) .
24. E. Mikami, T. Goto, T. Ohno, H. Matsumoto, M. Nishida, *J.Pharm.Biomed.Anal.* 28 (2002) 261.
25. J. Jover, R. Bosque, J. Sales, *QSAR Comb.Sci.* 26 (2007) 385.
26. C.T. Abichandani, S.K.K. Jatkar, *J.Indian Inst.Sci.* 21A (1938) 417.
27. M.M.D. Sierra, A.N. Fernandes, B. Szpoganicz, *Talanta* 62 (2004) 687.
28. K.J. Reszka, L.H. Britigan, B.E. Britigan, *J Pharmacol Exp Ther* 315 (2005) 283.
29. R. Porto, G. De Tommaso, E. Furia, *Ann.Chim.* 95 (2005) 551.
30. K.L. Kuo, Y.Z. Hsieh, *J.Chromatog.A* 768 (1997) 334.
31. N. Binbuga, K. Chambers, W.P. Henry, T.P. Schultz, *Holzforschung* 59 (2005) 205.
32. Hansch, C.; Leo, A. *Log P Database*, Claremont CA, 1987.
33. Y. Korenman, T.P. Koroleva, *Zh.Prikl.Khim.* 48 (1975) 1413.
34. K. Carlsson, B. Karlberg, *Anal.Chim.Acta* 423 (2000) 137.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

35. T. Angelov, A. Vlasenko, W. Tashkov, *J.Liquid Chromatog.Rel.Tech.* 31 (2008) 188.
36. I. Boyd, E.G. Beveridge, *Microbios* 24 (1979) 173.
37. R. Santiago Valverde, I. Sanchez Perez, F. Franceschelli, M. Martinez Galera, M.D. Gil Garcia, *J.Chromatog.A* 1167 (2007) 85.
38. B. Haghighi, R. Dadashvand, *Anal.Bioanal.Chem.* 384 (2006) 1246.
39. Y. Huang, C. Zhang, X. Zhang, Z. Zhang, *Anal.Chim.Acta* 391 (1999) 95.
40. W. Liu, Y. Huang, *Anal.Chim.Acta* 506 (2004) 183.
41. Y. Huang, Z. Chen, *Talanta* 57 (2002) 953.
42. A. Paulenova, S.E. Creager, J.D. Navratil, Y. Wei, *J.Power Sources* 109 (2002) 431.
43. T. Taguchi, S. Hirayama, M. Okamoto, *Chem.Phys.Lett.* 231 (1994) 561.
44. Q. Zhang, M. Lian, L. Liu, H. Cui, *Anal.Chim.Acta* 537 (2005) 31.
45. A. Myint, Q. Zhang, L. Liu, H. Cui, *Anal.Chim.Acta* 517 (2004) 119.
46. S. Feng, X. Chen, G. Zhang, J. Fan, *Lihua Jianyan, Huaxue Fence* 39 (2003) 221.
47. Y. Huang, Z. Chen, *Talanta* 57 (2002) 953.
48. S.H. Hilal, S.W. Karickhoff, L.A. Carreira, B.P. Shrestha, *QSAR Comb.Sci.* 22 (2003) 917.
49. H. Cui, R. Meng, H. Jiang, Y. Sun, X. Lin, *Luminescence* 14 (1999) 175.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

50. U.R. Chaudhari, B.M. Rao, Zeitschrift fuer Physikalische Chemie 270 (1989) 412.

51. H. Cui, R. Meng, H. Jiang, Y. Sun, X. Lin, Luminescence 14 (1999) 175.

52. Miller, N. J.; Miller, J. C. *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*, 4 ed.; Prentice Hall: Madrid, 2002.

53. A. Myint, Q. Zhang, L. Liu, H. Cui, Anal.Chim. Acta 517 (2004) 119.

54. J.F. Jen, Y.Y. Tsai, T.C. Yang, J.Chromatog.A 912 (2001) 39.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Table 1. Different CL response (%) of PCs with different reactions

Compound	CL reactions		
	Ce(IV) + Tween 20 ^a (%)	Ce(IV) + Rho 6G ^b (%)	Ce(IV) + Tween 20 + Rho 6G ^c (%)
Resorcinol	0.86	2.63	1.76
PH	0.00	42.33	0.00
DHBA	4.60	72.64	6.91
Rutin	0.00	0.27	0.00
Caffeic acid	0.60	0.35	0.00
Vanillin	0.74	0.77	0.00
SA	5.52	0.83	1.10
MP	0.98	100.00	4.40
PG	1.24	4.61	1.99

^a $6.4 \cdot 10^{-3}$ M of Ce(IV), 9 % tween 20 and $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ of phenolic compounds (PCs)

^b $2 \cdot 10^{-2}$ M and $4 \cdot 10^{-4}$ M Rho 6G and $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ of PCs

^c $2 \cdot 10^{-2}$ M, $4 \cdot 10^{-4}$ M Rho 6G and 9 % tween 20; $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ of PCs

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Table 2. Analytical parameters for the mixture of PCs studied.

Parameter	Phenolic compounds				
	PH	DHBA	SA	MP	PG
b/ mV ⁻¹	0.017	0.0036	0.020	0.0031	0.114
S _b / mV ⁻¹	0.001	0.0003	0.004	0.0004	0.008
a/mg·l ⁻¹	0.0191	0.00719	0.054	0.0144	1.50
S _a /mg·l ⁻¹	0.0001	0.00004	0.001	0.0001	0.04
R ² /%	99.76	99.91	99.23	99.83	98.18
LDR/M	3.96·10 ⁻⁷	3.24·10 ⁻⁷	7.24·10 ⁻⁷	6.57·10 ⁻⁷	9.43·10 ⁻⁶
	to 9.52·10 ⁻⁵	to 7.79·10 ⁻⁵	to 8.69·10 ⁻⁵	to 7.89·10 ⁻⁵	to 2.36·10 ⁻⁴
LOD/M	8.80·10 ⁻⁸	2.70·10 ⁻⁸	2.30·10 ⁻⁸	5.15·10 ⁻⁸	4.08·10 ⁻⁶
LOQ/M	2.07·10 ⁻⁷	6.28·10 ⁻⁸	5.44·10 ⁻⁷	1.12·10 ⁻⁷	9.61·10 ⁻⁶
RSD [*] /%	13.50	4.61	6.22	2.42	9.81
RSD ^{**} /%	4.43	2.75	5.16	3.61	6.83
RSD ^{***} /%	4.36	2.86	2.59	4.17	6.67

b slope; S_b standard deviation of slope; a intercept; S_a standard deviation of intercept; R correlation coefficient; LDR limit dynamic range; LOD limit of detection; LOQ limit of quantification; RSD^{*} relative standard deviation for a 0.05 mg·l⁻¹ (low concentration) of PCs; RSD^{**} relative standard deviation for a 2 mg·l⁻¹ of PCs (medium concentration); RSD^{***} relative standard deviation for a 12 mg·l⁻¹ of PCs (higher concentration).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Table 3. Results obtained by reference and proposed methods in real samples.

Sample	Analyte	Proposed method*	Reference method*	P _{value} / %
Cleaning gel	SA	14.0 ± 0.1	14.08 ± 0.04	75.8
	MP	9.1 ± 0.5	9.6 ± 0.3	17.7
Callus corrector cream	SA	16.8 ± 0.4	17.96 ± 0.05	5.0
	MP	4.2 ± 0.2	4.289 ± 0.007	5.0

* Concentrations are expressed in mg.l⁻¹

Figure captions

Figure 1. FIA manifold for the separation of phenolic compounds using a mini-column with CL detection.

Figure 2. Dependence of the retention time on pH (A) and the percentage of ACN (B). All points are the average of three replicas. Bars represent the apparition time of the peak, the retention time and the outlet time. Conditions: pH adjusted with phosphate and acetate buffers and hydrochloric acid (10^{-2} M). Conditions: $5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ of all standards. Flow rate: $1.2 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Loop volume: $75 \text{ }\mu\text{l}$.

Legend: ■ PH ■ DHBA □ SA □ MP ■ PG

Figure 3. Variation of the retention time with the flow rate. Conditions of carriers: pH 3 of acetate buffer and 5% of ACN. Flow rate: variable; standards at $5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$; Loop volume: $75 \text{ }\mu\text{l}$. Legend:

■ PH ■ DHBA □ SA □ MP ■ PG

Figure 4. Optimization of the concentrations of the CL reagents for the determination of phenolic compounds: A) Ce(IV) concentration, maintaining constant $4\cdot 10^{-4}$ M Rho 6G, $1.5 \text{ M H}_2\text{SO}_4$ and $75 \text{ }\mu\text{l}$ of loop volume; B) H_2SO_4 concentration, maintaining constant 10^{-2} M Ce(IV), 10^{-4} M Rho 6G and $75 \text{ }\mu\text{l}$ of loop volume; C) Rhodamine 6G concentration, maintaining constant $2\cdot 10^{-2}$ M Ce(IV), $2 \text{ M H}_2\text{SO}_4$ and $75 \text{ }\mu\text{l}$ of loop volume M; D) loop volume, maintaining constant 10^{-2} M Ce(IV), 10^{-4} M Rho 6G and $0.5 \text{ M H}_2\text{SO}_4$. Figures E and F present the effect of the loop volume increase from 150 to $300 \text{ }\mu\text{l}$. In all cases we use $5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ for PH, SA and PG and $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ for DHBA and MP.

Legend: ◆ PH, ■ DHBA, ▲ SA, □ MP and ○ PG

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Figure 5. A) Chromatogram of the phenolic compounds ($1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) at optimum conditions. This record has two parts separated for the change of carrier A to B at 150 s; the first part includes PH (1), DHBA (2) and SA (3); and the second part MP (4) and PG (5). The change of selection valve at 150 s (6) produces a small perturbation in the baseline due to the change of Ce(IV) and Rho 6G concentrations. B) CL record for standards and samples (cleaning gel and callus corrector cream).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

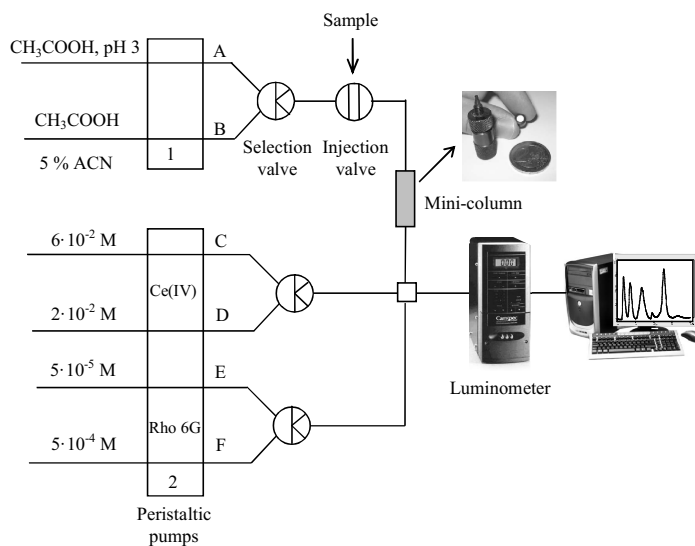


Figure 1

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

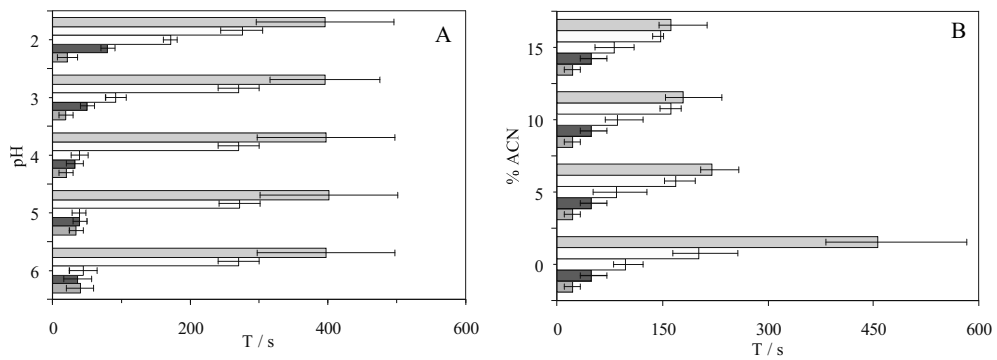


Figure 2

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

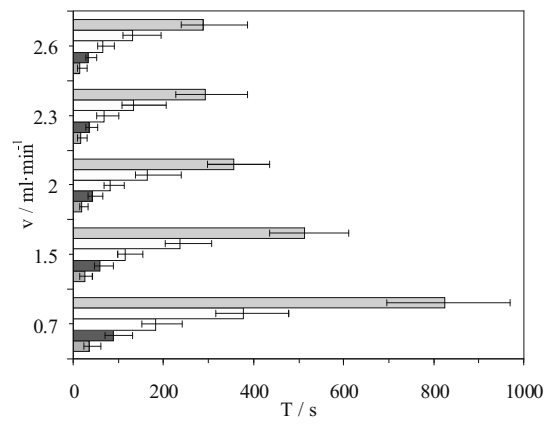


Figure 3

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

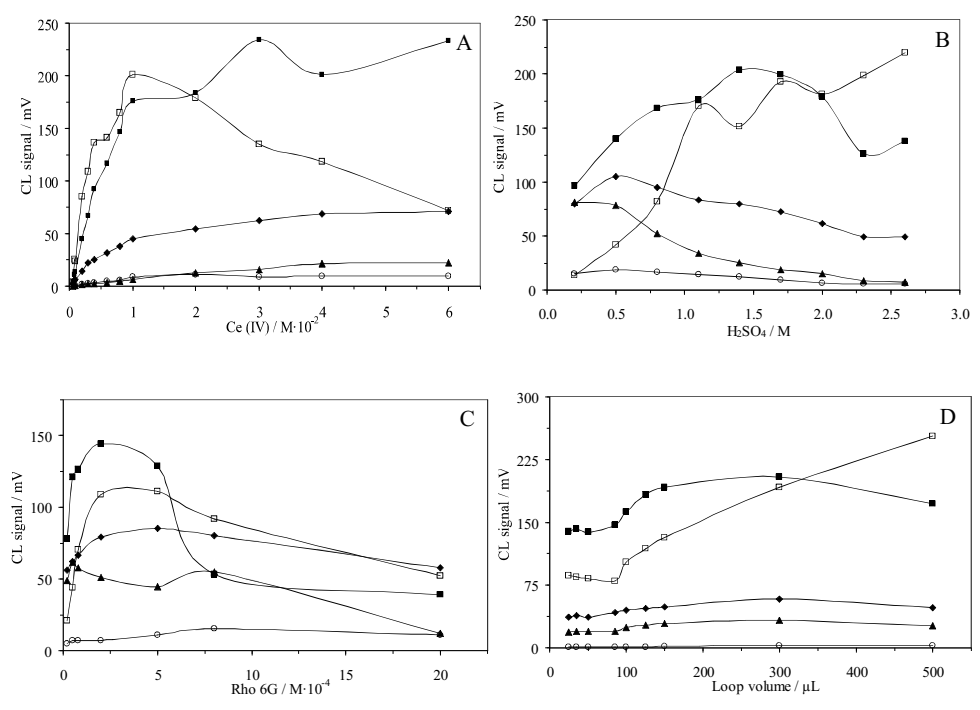


Figure 4

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

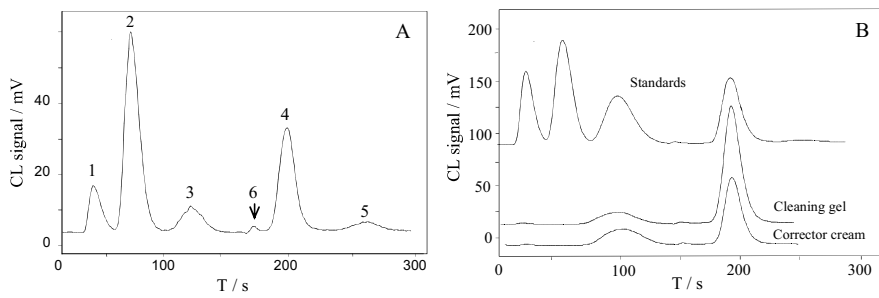


Figure 5