



UNIVERSIDAD DE JAÉN

**FACULTAD DE CIENCIAS
EXPERIMENTALES
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
FÍSICA Y ANALÍTICA**

TESIS DOCTORAL

**ANÁLISIS DE PRINCIPIOS ACTIVOS Y
CONSTITUYENTES NATURALES O
CONTAMINANTES DE ALIMENTOS
MEDIANTE SENSORES
LUMINISCENTES EN FLUJO**

**PRESENTADA POR:
LUCÍA MOLINA GARCÍA**

**DIRIGIDA POR:
DR. D. ANTONIO RUIZ MEDINA
DRA. DÑA. LUISA FERNÁNDEZ DE CÓRDOVA**

JAÉN, 18 DE MAYO DE 2012

**ISBN 978-84-8439-661-1
DEPÓSITO LEGAL J-1193-2012**



UNIVERSIDAD DE JAÉN

FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA Y ANALÍTICA

**Análisis de principios activos y constituyentes
naturales o contaminantes de alimentos mediante
sensores luminiscentes en flujo**

TESIS DOCTORAL

Lucía Molina García

Jaén 2012

**ANÁLISIS DE PRINCIPIOS ACTIVOS Y CONSTITUYENTES
NATURALES O CONTAMINANTES DE ALIMENTOS MEDIANTE
SENSORES LUMINISCENTES EN FLUJO**

Los Directores:

Fdo. Dr. Antonio Ruiz Medina

(Profesor Titular. Universidad de Jaén)

Fdo. Dra. M^a Luisa Fernández

de Córdoba

(Profesora Titular. Universidad de Jaén)

Memoria de Investigación presentada para aspirar al grado de Doctor en Química, con
mención de Doctorado Internacional, por la Universidad de Jaén

Fdo. Lucía Molina García

Jaén, 2012

“Si he conseguido ver más lejos,
es porque me he aupado en hombros de gigantes”

(Isaac Newton)

A mis padres
A mis hermanos

ÍNDICE

OBJETIVOS	3
SUMMARY	7
CAPÍTULO I. Justificación e Introducción	13
A. Justificación	13
B. Introducción	14
1. Métodos automáticos de análisis	15
1.1. Tipos de sistemas analíticos automáticos	15
1.2. Sistemas analíticos automáticos continuos	16
2. Análisis por Inyección en Flujo (FIA)	19
2.1. Características esenciales de la metodología FIA	19
2.2. Componentes básicos de un sistema FIA.....	20
2.3. Características analíticas de los métodos FIA.....	27
3. Otras metodologías de análisis por inyección en flujo	30
3.1. Análisis por Inyección Secuencial (SIA)	30
3.2. Multiconmutación (MCFIA).....	32
4. Optosensores en flujo continuo	38
4.1. Integración de la Espectroscopía en Fase Sólida (SPS) y el Análisis por Inyección en flujo (FIA)	38
4.2. Fundamento de los optosensores en flujo continuo	40
4.3. Componentes de los optosensores en flujo continuo	43
4.4. Desarrollo de optosensores en flujo continuo: optimización de variables experimentales	51
5. Los analitos y su determinación	56
5.1. Principios activos	56
5.1.1. Cromolín	56
5.1.2. Cefadroxilo.....	57
5.1.3. Indometacina	58
5.2. Compuestos de interés en alimentos y bebidas	59
5.2.1. Constituyentes naturales.....	59
5.2.1.1. Resveratrol	59
5.2.1.2. Piceido.....	61
5.1.2. Contaminantes	63
5.2.1.1. Aflatoxina B ₁	63
5.2.1.2. Bisfenol A	64

CAPÍTULO II. Discusión conjunta de resultados	69
1. Reactivos e Instrumentación	70
1.1. Reactivos	70
1.2. Instrumentación.....	70
2. Optimización de las variables de la unidad de retención/detección	78
2.1. Elección del soporte sólido	78
2.2. Características espectrales	81
3. Optimización de las variables instrumentales	85
4. Configuración del sistema de flujo y procedimiento general	87
5. Optimización de las variables químicas	96
6. Optimización de las variables del sistema de flujo	105
7. Calibración de los sensores. Parámetros analíticos	111
8. Estudio del efecto de posibles especies interferentes	116
8.1. Sensores para la determinación de principios activos.....	116
8.2. Sensores para la determinación de compuestos de interés en alimentos y bebidas	119
9. Aplicaciones analíticas	120
9.1. Sensores para la determinación de principios activos.....	121
9.1.1. Preparación de muestra	121
9.1.2. Análisis de muestra	121
9.2. Sensores para la determinación de compuestos de interés en alimentos y bebidas	123
9.2.1. Preparación de muestra	123
9.2.2. Análisis de muestra	130
CONCLUSIONS	143
ANEXO A: Contribuciones científicas derivadas de esta Memoria	147
1. Publicaciones científicas	147
2. Comunicaciones a Congresos Internacionales	147
ANEXO B: Otras contribuciones científicas	149
1. Publicaciones científicas	149
2. Comunicaciones a Congresos Internacionales	149

Acrónimos y abreviaturas

SPS	Espectroscopía en Fase Sólida (Solid Phase Spectroscopy)
FIA	Análisis por Inyección en Flujo (Flow Injection Analysis)
MCFIA	Sistema de Flujo Multiconmutado o Multiconmutación (Multicommutated Flow System)
SIA	Análisis por Inyección Secuencial (Sequential Injection Analysis)
LSL	Luminiscencia Sensibilizada por Lantánido (Lanthanide Sensitized Luminescence)
CL	Quimioluminiscencia (Chemiluminescence)
PIF	Fluorescencia Inducida Fotoquímicamente (Photochemically Induced Fluorescence)
SPE	Extracción en Fase Sólida (Solid Phase Extraction)
SCG	Cromoglicato disódico o Cromolín (Disodium cromoglycate or Cromolyn)
CFD	Cefadroxilo (Cefadroxil)
INM	Indometacina (Indomethacin)
RVT	Resveratrol (Resveratrol)
PCD	Piceido (Piceid)
AFB₁	Aflatoxina B ₁ (Aflatoxin B ₁)
BPA	Bisfenol A (Bisphenol A)

OBJETIVOS

Objetivos

El objetivo general de esta Memoria es contribuir al avance en el grado de automatización de los optosensores en flujo continuo. Se plantea para ello la implementación en estos últimos de metodologías recientes de análisis por inyección en flujo tales como la multiconmutación (MCFIA) y el análisis por inyección secuencial (SIA), poco utilizadas hasta la fecha en este tipo de sistemas.

Otro de los objetivos del trabajo de investigación que aquí se presenta es ampliar el rango de aplicación de los optosensores en flujo continuo al análisis de matrices complejas como es el caso de los alimentos. Son numerosas las aplicaciones descritas en bibliografía para la determinación de compuestos orgánicos en fármacos y aguas, siendo mucho más escasos los optosensores en flujo continuo desarrollados para aquellos. Con este fin, se pretende mejorar la sensibilidad y selectividad de la determinación fluorescente convencional, haciendo uso para ello del desarrollo de nuevos tratamientos de muestra y la utilización de técnicas de detección luminiscente tales como la fluorescencia inducida fotoquímicamente (PIF), la luminiscencia sensibilizada por lantánido (LSL) y la quimioluminiscencia. Estas últimas presentan un importante potencial que aún no ha sido explotado suficientemente para el desarrollo de optosensores en flujo continuo.

Los analitos seleccionados en esta Memoria son principios activos de fármacos y compuestos de interés en el análisis de alimentos y bebidas. Estos últimos incluyen componentes naturales y contaminantes tóxicos de gran interés en la actualidad. En todos los casos se pretende proponer nuevos métodos de análisis que ofrezcan características tales como sensibilidad, selectividad, rapidez, sencillez y bajo coste, y que puedan representar una interesante alternativa a los bien establecidos métodos cromatográficos para el análisis de preparados farmacéuticos, fluidos biológicos, alimentos y bebidas.

SUMMARY

Summary

In the present Research Report the development of eight spectroscopic flow-through sensors, making use of sequential injection analysis (SIA) and multicommuted flow injection analysis (MCFIA) as automation methodologies, is described. The basis of these optosensors is the combination of solid phase spectroscopy (SPS) and continuous-flow systems. Various luminescence detection techniques have been used, fluorescence (native and after chemical derivatization), photochemically induced fluorescence (PIF), lanthanide sensitized luminescence (LSL) and chemiluminescence (CL). In order to evaluate the potential of these optosensors for the determination of organic compounds in pharmaceutical, clinical and food analysis, resveratrol, piceid, cefadroxyl, cromolyn, indomethacin, bisphenol A and aflatoxin B₁ have been chosen as model analytes, being all of them compounds of interest in these areas.

The luminescent flow-through sensors developed in this work can be classified according to various criteria:

A first classification could be made according to the flow system used for the automation of the optosensor, MCFIA or SIA. Six optosensors based on MCFIA methodology (cefadroxil, piceid, resveratrol, resveratrol and piceid, aflatoxin B₁ and bisphenol A) and two ones based on SIA (cromolyn and indomethacin) are proposed. The use of MCFIA or SIA methodologies allows a higher degree of automation than conventional flow-injection analysis (FIA) systems and other additional advantages such as better reproducibility, more simplicity and versatility of the flow system, a minor consumption of sample and reagents and a significant decrease of waste. In optosensors making use of MCFIA, three-way solenoid valves controlled temporally through a microprocessor have been used for the insertion of solutions in the flow system, which has allowed the automation of the different steps of the procedure. In optosensors based on SIA, the automation of the whole procedure has also been possible by using software for the control of the operation of the single piston bomb and selection valve.

A second classification of the proposed optosensors would attend to the number of analytes that can be determined, so distinguishing between optosensors which allow the determination of one analyte (monoparameter) or more than one analyte (multiparameter). In this work seven monoparameter optosensors (cromolyn, cefadroxil, indomethacin, piceid, resveratrol, aflatoxin B₁ and bisphenol A) and one biparameter optosensor (resveratrol and piceid) have been developed. In this last case, the strategy employed for the separation of the analytes was based on the insertion in the flow system of a minicolumn packed with a suitable solid support on which the monitored species showed different retention/elution kinetics. This one was placed before the flow cell and

allowed the sequential arrival of the monitored species to the detection area, so making possible an on-line separation and, consequently, the determination of two analytes with one only sample insertion. The analytical potential of this approach was successfully proved by means of its application to the analysis of resveratrol and its glycosilated form, piceid, in wines.

Finally, the optosensors developed can be classified according to the detection technique used, native fluorescence (bisphenol A), fluorescence obtained after a chemical derivatization (indomethacin), PIF (piceid, resveratrol, resveratrol and piceid and aflatoxin B₁), LSL (cromolyn) and CL (cefadroxil). To date, these three last luminescent techniques, which provide additional advantages with respect to conventional fluorimetry, have not been sufficiently exploited in the field of flow-through optosensors.

In the development of every optosensor an exhaustive optimization of the experimental variables influencing the system has been carried out: retention/detection unit, instrumental, chemical and flow variables. In the biparameter optosensor, the optimal amount of solid support filling the minicolumn and the appropriate place of this latter in the flow system were also established. In the case of using PIF detection it was also necessary to optimize the irradiation time, which is one of the most critical variables. In addition, in order to improve the applicability of the optosensors developed for the analysis of pharmaceuticals and biological fluids, the corresponding method was proposed for two different volumes of sample.

Under the established optimum working conditions, the calibration curves were constructed and the corresponding analytical parameters were determined. In the optosensors developed for the analysis of active ingredients, an interference study was also carried out in order to determine the tolerance of the system to the presence of organic and inorganic species which usually accompany to the analytes in real samples. Nevertheless, in the case of the systems applied to beverages or food analysis, the identification of some of the constituents/contaminants of these latter that could be important interferents and a subsequent study of their elimination in the treatment of sample were carried out. Finally, the proposed methods were applied to the analysis of real samples (pharmaceuticals, biological fluids, milk, infant formulas, wine, cocoa powder, chocolate and beer). The results obtained were validated by means of a comparison with those provided by a reference method and/or a recovery study at various concentration levels. In all the cases, very satisfactory results were achieved.

The good results obtained demonstrate the applicability of flow-through optosensors to solve a lot of analytical problems in very diverse fields. In the last years, these systems have been widely applied to the routine analysis of simple samples such as pharmaceutical preparations. However, as demonstrated in this work, they are also suitable for the resolution of more complex

analytical problems, such as the analysis of natural constituents or contaminants in foods and beverages. As an example, we can point out that the methods here proposed for the determination of unhealthy organic compounds allow their determination at concentration levels below the maximum residue levels (MRLs) established by European Legislation. On the other hand, some of the methods here developed have allowed overcoming important limitations of the well-established chromatographic methods previously reported for the same application and, consequently, they can be considered as an interesting alternative to these latter. All this is consequence of the combination of the most remarkable advantages of these systems (high sensitivity and selectivity, simplicity, high throughput and cost-effectiveness) with an appropriate sample treatment.

CAPÍTULO I
Justificación e Introducción

Justificación e Introducción

A. Justificación

Esta Memoria forma parte de una de las líneas de investigación desarrollada por el Grupo de Investigación “Innovaciones en Análisis Químico”, del Plan Andaluz de Investigación (PAI: Grupo FQM 363), cuyo objetivo principal es el desarrollo de nuevas metodologías analíticas de análisis por inyección en flujo continuo con detección espectroscópica en fase sólida.

Las investigaciones de esta línea van dirigidas al desarrollo de nuevos sensores luminiscentes en flujo continuo para la determinación de analitos de diferente naturaleza en campos tan diversos como el farmacológico, clínico, agroalimentario y medioambiental. De este modo, se pretende aportar mejores y nuevos avances tecnológicos, poniendo especial interés en la completa automatización de los sensores a través del uso de metodologías como MCFIA y SIA. Con el objetivo de incrementar la selectividad, además de los sensores fluorimétricos, que han sido los más desarrollados, se exploran otros sistemas de detección luminiscente poco utilizados, tales como PIF, LSL y CL.

Con este fin, se han puesto a punto optosensores mono y biparámetro que han permitido el análisis de muestras complejas tales como alimentos y bebidas. Hasta la fecha, los optosensores en flujo desarrollados por nuestro grupo se habían aplicado fundamentalmente al análisis de principios activos en fármacos o fluidos biológicos y a la determinación de pesticidas en aguas y alimentos. Por primera vez, se han desarrollado en esta Memoria optosensores para el análisis de componentes naturales de interés biológico en alimentos y bebidas, así como otros contaminantes distintos a los pesticidas de gran interés en la actualidad.

Cabe destacar que dichos optosensores suponen una alternativa interesante a los métodos cromatográficos ya existentes en la literatura, puesto que muchos de ellos además de proporcionar ventajas características tales como sencillez, rapidez, instrumentación de bajo coste y menor consumo de reactivos permiten alcanzar límites de detección más bajos. Es importante también señalar que, los sistemas desarrollados en esta Memoria generan una cantidad muy reducida de residuos, siendo respetuosos con el medioambiente.

B. Introducción

Los sensores espectroscópicos en flujo continuo surgen de la integración de la espectroscopía en fase sólida (SPS), practicada originariamente en modo discontinuo, con los sistemas de análisis por inyección en flujo continuo (FIA).

En 1976, Yoshimura propuso combinar el uso de un soporte sólido para preconcentrar la especie de interés con la medida directa de la absorción de luz de dicha especie retenida sobre la fase sólida, surgiendo así la SPS (“solid-phase spectroscopy”)¹. Los primeros trabajos se dedicaron al análisis de trazas metálicas² y después se extendieron al de compuestos orgánicos^{3,4}. Posteriormente la SPS se automatizó integrándose con el FIA, incorporando el soporte sólido en una célula de flujo. De esta forma se obtiene una superficie sólida activa en contacto con una corriente que fluye a su través, combinada con la monitorización de la interacción entre dicho flujo y el soporte sólido. Este dispositivo, propuesto por Ruzicka y Hansen⁵, fue llamado sensor óptico en flujo (flow-through optosensor).

¹ K. Yoshimura, H. Waki, S. Ohashi, *Talanta* 23 (1976) 449-454.

² K. Yoshimura, H. Waki, *Talanta* 32 (1985) 345-352.

³ F. Capitán, E. Alonso, R. Avidad, L.F. Capitán-Vallvey, J.L. Vílchez, *Analytical Chemistry* 65 (1993) 1336-1339.

⁴ P. Ortega-Barrales, M.L. Fernández-de Córdova, A. Molina-Díaz, *Analytical Chemistry* 70 (1998) 271-275.

⁵ J. Ruzicka, E.H. Hansen, *Analytica Chimica Acta* 173 (1985) 3-21.

1. Métodos automáticos de análisis

Los avances en la ciencia y la tecnología han suscitado una creciente demanda de análisis de control planteando nuevos retos a la química analítica, tales como la necesidad de desarrollar nuevos métodos que presenten la mayor selectividad y sensibilidad posible, así como un menor coste en el uso de reactivos y muestras, y que además sean sencillos, rápidos y respetuosos con el medioambiente. De esta necesidad surgen los sistemas automáticos de análisis en flujo.

1.1. Tipos de sistemas analíticos automáticos

Los sistemas automáticos permiten realizar acciones previamente programadas por el operador para ser llevadas a cabo en unos momentos determinados del proceso sin intervención humana. Estos sistemas no toman decisiones por sí mismos y siguen siempre la misma secuencia de operación.

En función de cómo ocurre el proceso, los métodos automáticos se clasifican en discontinuos y continuos, encontrándose en algunas ocasiones una combinación de ambos:

➤ *Discontinuos.* La muestra se mantiene separada en un receptáculo (cubeta) en el que tienen lugar las distintas etapas analíticas (adición de reactivos, agitación, calentamiento, dilución) (*Figura I.1*). Posteriormente se lleva a la unidad de detección donde se obtiene una señal analítica puntual para cada muestra, después de haber alcanzado el equilibrio químico (o estado estacionario).

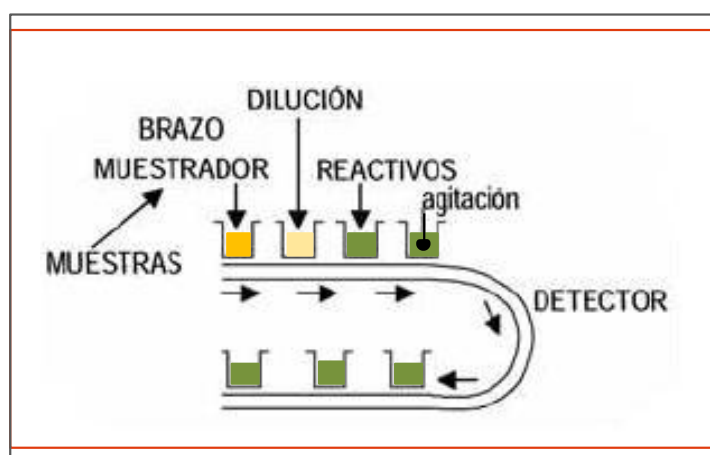


Figura I.1. Esquema general de un sistema analítico automático discontinuo

➤ *Continuos.* La medida analítica se realiza sin interrumpir el flujo de un líquido o gas. Las muestras se van introduciendo directamente, a intervalos regulares de tiempo, en un canal por el que

fluye un portador que puede ser el propio reactivo, en caso de ser necesaria una reacción química, o que confluye con éste. El flujo pasa continuamente por la célula de medida (cubeta de flujo) situada en la zona de detección de un detector apropiado, en donde se realizan las medidas analíticas, obteniéndose señales analíticas transitorias. La *Figura I.2* muestra un ejemplo de un sistema de este tipo.

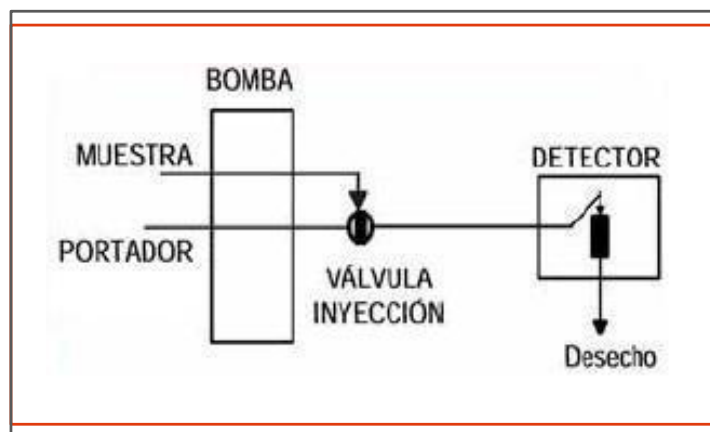


Figura I.2. Esquema general de un sistema analítico automático continuo

1.2. Sistemas analíticos automáticos continuos

Una clasificación general de los métodos automáticos continuos podría incluir dos grupos fundamentales: sistemas continuos de flujo segmentado y de flujo no segmentado. En la *Tabla I.1* se muestra una clasificación de los métodos automáticos continuos basada en el modo en que se elimina la posible mezcla entre las muestras sucesivas⁶.

⁶ M. Valcárcel, M.D Luque de Castro, *Automatic Methods of Analysis*, Elsevier, 1988.

Tabla I.1. Métodos automáticos continuos

Flujo	Introducción de muestras		Naturaleza del flujo	Metodología
	Procedimiento	Tiempo		
Segmentado	Aspiración	Secuencial	Continuo	Análisis en flujo segmentado (SFA)
		Inyección	Secuencial	Continuo
No segmentado	Aspiración	Secuencial	Discontinuo	Métodos cinéticos a flujo detenido
		Continua	Continuo	Análisis en flujo completamente continuo (CCFA)
		Secuencial	Continuo	
		Secuencial	Discontinuo	Análisis en flujo con dispersión controlada (CDFA)

➤ *Sistemas continuos de flujo segmentado.* Las muestras son aspiradas secuencialmente y entre ellas se insertan burbujas de aire que segmentan (separan físicamente) el flujo. Estas burbujas evitan la contaminación entre muestras sucesivas, impiden la dispersión del bolo de muestra en el portador y facilitan la mezcla entre la muestra y los reactivos, favoreciendo que se alcance el equilibrio físico y químico antes de la llegada al detector. Estos sistemas generalmente contienen una unidad de eliminación de burbujas antes del detector para impedir la posible interferencia de las mismas en la medida analítica.

➤ *Sistemas continuos de flujo no segmentado.* Estos sistemas se caracterizan por la ausencia de burbujas en todas las líneas y una mayor simplicidad técnica. La diferencia fundamental con los sistemas continuos de flujo segmentado es que no se alcanza el equilibrio físico (homogeneización del flujo) ni químico (desarrollo completo de la reacción química). Debido a este hecho, se hace necesario que las medidas se lleven a cabo en condiciones altamente reproducibles y a un tiempo fijo, ya que pequeñas variaciones pueden afectar significativamente a la señal analítica. La forma en la que se evita la contaminación entre muestras difiere de una a otra metodología. Así en el caso del FIA, las muestras son introducidas secuencialmente mediante inyección o inserción de un volumen, previamente establecido, en una corriente continua de flujo de reactivo o portador.

De todos los métodos automáticos continuos, se desarrollará a continuación el FIA que es la base de todos los sistemas desarrollados en esta Memoria de Investigación.

2. Análisis por Inyección en Flujo (FIA)

El FIA es una modalidad de los sistemas en flujo continuo, en la que el flujo no está segmentado por burbujas de aire. Este sistema fue descrito por primera vez a mediados de la década de los setenta por Ruzicka y Hansen⁷ en Dinamarca y Stewart⁸ en Estados Unidos. Esta metodología presenta gran versatilidad, ya que las posibilidades y aplicaciones analíticas son muy numerosas, con un presupuesto reducido y gran sencillez en el manejo, proporcionando resultados de una manera rápida y con gran exactitud y precisión⁹. Además, este tipo de metodología presenta suficiente robustez para soportar el tratamiento habitual en un laboratorio analítico de control. También es posible el empleo de cualquier detector usual, con el único requisito de que se pueda introducir la muestra en flujo. El término FIA se mantiene por razones históricas, debido a que Ruzicka y Hansen¹⁰ empleaban una jeringa para introducir la muestra en el flujo, aunque, actualmente se realiza por inserción con válvulas rotatorias o mediante el uso de un inyector proporcional.

2.1. Características esenciales de la metodología FIA

Las características esenciales de la metodología FIA son¹¹:

- Flujo no segmentado, por lo que no existen burbujas de aire en ninguna de las líneas del sistema, lo que lo diferencia de los métodos de análisis en flujo segmentado.
- Inserción o inyección directa de un volumen bien definido de muestra en el flujo, en lugar de su aspiración.
- Transporte del bolo de muestra inyectado/insertado a través del sistema. Puede existir también un proceso químico y/o físico-químico adicional al transporte (reacción química, diálisis, extracción líquido-líquido, etc.).
- Dispersión o dilución parcial del analito durante el transporte, que puede ser controlada a través de las características geométricas e hidrodinámicas del sistema.
- Señal transitoria, proporcionada por un sistema de detección continua, que es convenientemente registrada (fiagrama).

⁷ J. Ruzicka, E.H. Hansen, *Analytica Chimica Acta* 78 (1975) 145-157.

⁸ K.K. Stewart, G.R. Beecher, P.E. Hare, *Analytical Biochemistry* 70 (1976) 167-173.

⁹ R.C. Prados-Rosales, J.L. Luque-García, M.D. Luque de Castro, *Analytica Chimica Acta* 480 (2003) 181-192.

¹⁰ J. Ruzicka, E.H. Hansen, *Flow Injection Analysis*, J.Wiley, New York, 1981.

¹¹ M. Valcárcel, M.D Luque de Castro, *Flow Injection Analysis. A practical guide*, Elsevier, 1989.

- No se alcanza el equilibrio físico (supondría la homogeneización de una porción del flujo) ni el equilibrio químico (reacción completa) cuando se registra la señal, por lo que puede enmarcarse dentro de los Métodos Cinéticos de Análisis, en su modalidad de medida a tiempo fijo.
- Necesidad de reproducibilidad del tiempo de operación, ya que las medidas se realizan en condiciones de no equilibrio, y por tanto pequeñas variaciones en el tiempo en el que se llevan a cabo las operaciones pueden suponer grandes variaciones en los resultados.

2.2. Componentes básicos de un sistema FIA

Un sistema FIA elemental debe estar integrado por una serie de componentes básicos que proporcionen las condiciones ideales para el análisis. A continuación se muestra un esquema de estos componentes (*Figura I.3*) y se describen las características principales de cada uno.

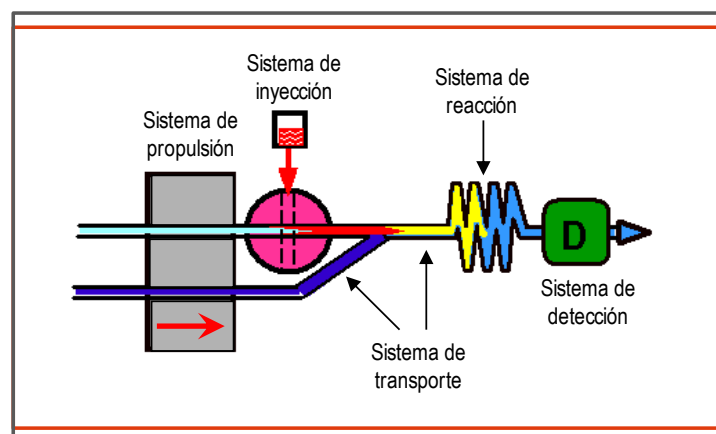


Figura I.3. Elementos básicos de un sistema FIA

2.2.1. Sistema de propulsión

Establece un flujo de caudal constante y regular en el sistema, además de perfectamente reproducible. Otra característica muy deseable es que proporcione un flujo libre de pulsos. Su función es la de permitir la propulsión de las diferentes disoluciones empleadas en el sistema por sus correspondientes líneas. Para ello existen diferentes mecanismos: bombas, sistemas de presión o sistemas de gravedad. El sistema más utilizado son las bombas peristálticas. La propulsión de las disoluciones por medio de estas bombas se basa en la presión que ejerce una serie de cilindros rotatorios, ubicados en la cabeza de un tambor rotatorio, sobre unos tubos de plástico flexible

(Figura I.4). El caudal que proporcionan estas bombas viene determinado, entre otros factores, por la velocidad de giro de los cilindros y por el diámetro interno de los tubos.

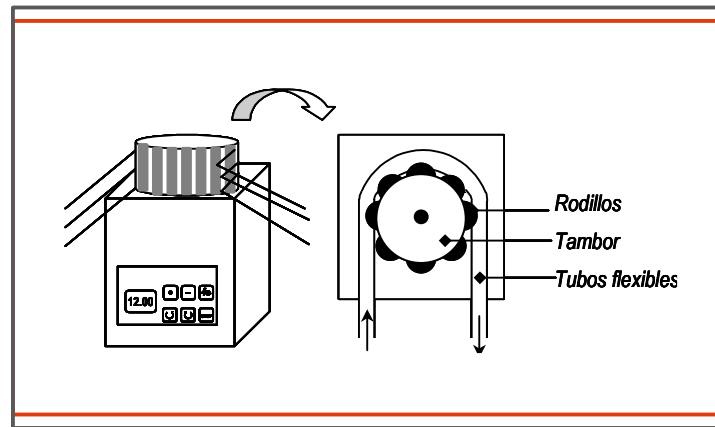


Figura I.4. Bomba peristáltica y vista esquemática de su parte superior

2.2.2. Sistema de inyección o introducción de muestra

Debe permitir la introducción o inserción de un volumen de muestra exactamente medido en la corriente portadora de forma completamente reproducible, sin crear perturbaciones en el flujo del portador. Los volúmenes deben ser variables en un amplio rango, ya que esto permite un aumento de la versatilidad del sistema. Estos dispositivos pueden controlarse mediante un motor eléctrico, y en cualquier caso, su utilización debe ser fácil, cómoda y rápida para ampliar la frecuencia de muestreo. Los primeros sistemas de inyección utilizados fueron jeringas y agujas hipodérmicas, así como el inyector proporcional, pero los más empleados actualmente son las válvulas rotatorias, generalmente de seis vías (Figura I.5).

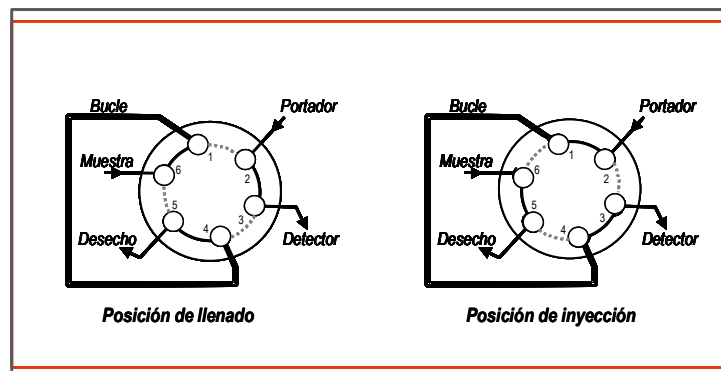


Figura I.5. Esquema de una válvula rotatoria de seis vías

Con estas válvulas de seis puertos los procesos de carga e inyección de muestra se efectúan por desplazamiento de un elemento móvil entre dos posiciones fijas, quedando definido el volumen

de muestra a inyectar por la longitud del bucle de muestra y el volumen interno de la válvula rotatoria.

2.2.3. Sistema de transporte

Tiene como misión fundamental conectar entre sí los diferentes elementos del sistema y conseguir en el transporte de los fluidos a su través un adecuado grado de dispersión de la muestra con la corriente portadora. La trayectoria del flujo debe ser fácilmente programable para realizar una amplia variedad de ensayos; además, el flujo debe ser totalmente reproducible. Se utilizan tubos de pequeño diámetro (0.1-2 mm) de un material químicamente inerte y termoestable, siendo los más usados el teflón, polietileno y propileno.

2.2.4. Sistema de reacción

Dentro del sistema FIA se suelen incorporar reactores, que permiten que se den procesos adicionales (reacciones) simultáneamente con el transporte. Se suelen emplear los mismos tubos que en el sistema de transporte, encontrándose en este caso enrollados en forma helicoidal. Este sistema de reacción puede estar calentado por baños termostatzados o mantas eléctricas. Estos tubos a su vez pueden tener confluencias, cámaras de mezcla o reactores en “fase sólida” (capilar relleno de un soporte sólido activo químicamente).

2.2.5. Sistema de detección

Debe permitir la medida continua de una propiedad del analito o de un producto de reacción de éste, proporcionando información cuantitativa y cualitativa. Para que un detector sea adecuado como sistema de medida FIA, éste debe de poseer algunos atributos claramente definidos, tales como: pequeño volumen, bajo ruido, respuesta rápida y lineal en un amplio rango de concentraciones y alta sensibilidad.

Los sistemas de detección FIA pueden medir directamente una propiedad nativa de la especie disuelta en la muestra inyectada, o bien necesitar una reacción adicional que origina un producto de reacción detectable. De esta manera el FIA puede aplicarse a especies activas o inactivas según su comportamiento en relación con el sistema de detección.

Los sistemas de detección más usados en FIA son los detectores ópticos y electroanalíticos, que se comentan a continuación.

➤ Detectores Ópticos

Son los sistemas de detección más usados en FIA, debido al gran número de especies que pueden determinarse por este tipo de técnicas, bien por sus propiedades intrínsecas o por las de un producto de reacción con un reactivo determinado. Los más usados son los detectores de absorción molecular, seguidos por los de fluorescencia molecular. También se emplea la espectroscopía vibracional (infrarrojo y raman) y atómica. En el apartado 4.3.3 de este Capítulo estos sistemas serán comentados con mayor amplitud.

▪ *Espectrofotometría UV-visible*

Es, con diferencia, el método de detección más utilizado en FIA debido al elevado número de especies que absorben en la región UV-visible o que pueden ser derivatizadas para generar un producto absorbente. Existe pues un gran número de métodos basados en reacciones selectivas coloreadas^{12,13,14} utilizables para todo tipo de compuestos y elementos¹⁵, así como una gran cantidad de compuestos que presentan bandas representativas en la zona UV del espectro¹⁶. Las cubetas empleadas suelen estar fabricadas con cuarzo o vidrio óptico para medidas en la región ultravioleta o visible del espectro, respectivamente.

▪ *Luminiscencia Molecular*

La espectroscopía de luminiscencia molecular es otra de las técnicas más empleadas para el desarrollo de métodos FIA. El fenómeno de la luminiscencia se basa en la emisión de energía en forma de radiación electromagnética (ultravioleta, visible o infrarroja cercana) por parte de moléculas, átomos o iones, como resultado de la transición desde un estado electrónicamente excitado a un estado de menor energía, normalmente el estado fundamental¹⁷. Las dos manifestaciones más conocidas de la luminiscencia producida por especies moleculares de utilidad analítica son la fluorescencia y la fosforescencia^{18,19}. Hoy en día numerosos métodos de análisis

¹² A. Molina-Díaz, I. Ortega-Carmona, M.I. Pascual-Reguera, *Talanta* 47 (1998) 531-536.

¹³ C.E. López Pasquali, P. Fernández Hernando, J.S. Durand Alegría, *Analytica Chimica Acta* 600 (2007) 177-182.

¹⁴ A. Dhaouadi, L. Monser, S. Sadok, N. Adhoum, *Analytica Chimica Acta* 576 (2006) 270-274.

¹⁵ A.M.R. Ferreira, J.L.F.C. Lima, A.O.S.S. Rangel, *Analisis* 24 (1996) 343-346.

¹⁶ M.I. Pascual-Reguera, G. Pérez Parras, A. Molina-Díaz, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 35 (2004) 689-695.

¹⁷ S. Kulmala, J. Suomi, *Analytica Chimica Acta* 500 (2003) 21-69.

¹⁸ J. Kuijt, F. Ariese, U.A.T. Brinkman, C. Gooijer, *Analytica Chimica Acta* 488 (2003) 135-171.

¹⁹ A. Fernández-Gutiérrez, S.G. Schulman, *Fosforescencia molecular analítica: una aproximación práctica*, Universidad de Granada, 2001.

basados en el fenómeno de la quimioluminiscencia se están poniendo también a punto²⁰. Por último, aunque menos utilizada es necesario destacar el uso de la LSL.

- *Espectroscopía Vibracional*

Los mayores inconvenientes del empleo de la espectroscopía infrarroja como forma de detección es la falta de transparencia de los disolventes empleados en la región del espectro correspondiente al infrarrojo, y la dificultad de montaje y limpieza de las células. El acoplamiento de la espectroscopía infrarroja con las técnicas de inyección en flujo ha hecho que el análisis cuantitativo de líquidos por esta técnica vaya ocupando un lugar cada día más importante en la literatura científica^{21,22,23}, aunque la sensibilidad no sea muy elevada. En particular, debido a su alta velocidad de barrido, se suele emplear la espectroscopía infrarroja mediante transformada de fourier (FTIR).

La espectroscopía raman también se puede aplicar como sistema de detección en los métodos FIA, tanto para especies inorgánicas como orgánicas. Los espectros raman tienden a ser menos confusos que los espectros de infrarrojo, por lo que es menos probable la superposición parcial en mezclas y las medidas cuantitativas son más sencillas. Además, la instrumentación raman requiere pequeños volúmenes de muestra y no está sujeta a la influencia negativa de la humedad.

A pesar de estas ventajas, la sensibilidad obtenida con raman no es muy elevada, lo que se puede mejorar notablemente con alternativas como la espectroscopía raman sensibilizada en superficie (SERS)^{24,25,26}. Esta técnica implica la obtención de los espectros de muestras que se adsorben en la superficie de partículas metálicas coloidales (normalmente plata, oro o cobre) o sobre superficies porosas de piezas de estos metales.

- *Espectroscopía atómica*

La implementación en sistemas FIA de técnicas de espectroscopía atómica como método de detección solventa el problema que supone un excesivo consumo de muestra en estas metodologías. En estos sistemas el portador es continuamente bombeado hacia el nebulizador, y

²⁰ A.M. García-Campaña, W.R.G. Baeyens, *Chemiluminescence in Analytical Chemistry*, Marcel Dekker, 2001.

²¹ S. Armenta, G. Quintás, J. Moros, S. Garrigues, M. de la Guardia, *Analytica Chimica Acta* 468 (2002) 81-90.

²² M.J. Ayora- Cañada, A. Ruiz-Medina, B. Lendl, *Applied Spectroscopy* 55 (2001) 356-360.

²³ P. Ortega-Barrales, M.J. Ayora-Cañada, A. Molina-Díaz, S. Garrigues, M. de la Guardia, *Analyst* 124 (1999) 579-582.

²⁴ M.J. Ayora-Cañada, A. Ruiz-Medina, J. Frank, B. Lendl, *Analyst* 127 (2002) 1365-1369.

²⁵ S. Lee, J. Choi, L. Chen, B. Park, J.B. Kyong, G.H. Seong, J. Choo, Y. Lee, K.H. Shin, E.K. Lee, S.W. Joo, K.H. Lee, *Analytica Chimica Acta* 590 (2007) 139-144.

²⁶ N. Weissenbacher, B. Lendl, J. Frank, H.D. Wanzelbock, B. Mizaikoff, R. Kellner, *Journal of Molecular Structure* 410-411 (1997) 539-542.

tras la inserción de muestra en el mismo se produce su nebulización. Posteriormente se origina la atomización e ionización (en los casos en los que sea necesaria) de la muestra sin necesidad de célula de flujo. Además, esta forma de trabajo favorece la existencia de una baja dispersión, con lo cual se consiguen bajos límites de detección. Las técnicas de espectroscopía atómica más utilizadas como sistema de detección en FIA son: absorción atómica^{27,28}, fotometría de llama²⁹, fluorescencia atómica³⁰ e ICP^{31,32}.

➤ Detectores Electroquímicos

Los detectores electroquímicos son de gran utilidad en sistemas hidrodinámicos debido a su selectividad, sensibilidad y linealidad de respuesta en un amplio rango de concentración. La propia naturaleza de los procesos electroquímicos, que generalmente ocurren en una superficie en lugar de hacerlo en el seno de la disolución, los hace muy atractivos y convenientes para la detección miniaturizada. El principal inconveniente que plantea este tipo de detectores lo constituye el material del electrodo. El envenenamiento de la superficie en el caso de electrodos sólidos debido a la adsorción se manifiesta en una pérdida de estabilidad a causa de la pasivación y consecuente disminución de la señal. Los detectores electroquímicos en FIA pueden clasificarse atendiendo a la base de la medida, la situación de la superficie activa o sensor responsable de la señal analítica y la posición del electrodo de referencia.

A continuación se comentan las técnicas electroanalíticas más utilizadas como sistema de detección en FIA.

▪ *Amperometría*

En esta técnica hay que distinguir entre los diseños que implican electrodos sólidos y los de gotas de mercurio (EGM). Los EGM³³ tienen la ventaja de una superficie continuamente renovada que asegura una sensibilidad y un nivel de la línea base estable. El campo de aplicación de estos detectores abarca, fundamentalmente, la determinación a muy bajas concentraciones de compuestos

²⁷ M. Burguera, J.L. Burguera, M.R. Brunetto, M. de la Guardia, A. Salvador, *Analytica Chimica Acta* 261 (1992) 105-113.

²⁸ M.C. Yebra, *TrAC-Trends in Analytical Chemistry* 19 (2000) 629-641.

²⁹ G.E. Roscoe, R. Miles, C.G. Taylor, *Analytica Chimica Acta* 234 (1990) 439-444.

³⁰ N.V. Semenova, L.O. Leal, R. Forteza, V. Cerdá, *Analytica Chimica Acta* 455 (2002) 277-285.

³¹ N. Yunes, S. Moyano, S. Cerutti, J.A. Gásquez, L.D. Martínez, *Talanta* 59 (2003) 943-949.

³² J.P. Valles Mota, M.R. Fernández de la Campa, J.I. García Alonso, A. Sanz-Medel, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 14 (1999) 113-120.

³³ J.J. Pedrotti, I.G.R. Gutz, *Talanta* 60 (2003) 695-705.

fisiológicamente activos, como neurotransmisores y sus precursores, y metabolitos^{34,35}. Han sido propuestos numerosos diseños de células; sin embargo, la geometría de la célula parece no tener gran influencia en parámetros como límites de detección y estabilidad del electrodo.

▪ *Potenciometría*

Un detector electroquímico en un sistema dinámico recibe el nombre de potenciométrico cuando la diferencia de potencial entre dos electrodos en condiciones de corriente constante (generalmente cero) se mide en función de los componentes del flujo. La detección potenciométrica presenta numerosas ventajas, como simplicidad del dispositivo experimental, sensibilidad, selectividad, rápida respuesta y química relativamente simple. Las desventajas más importantes son la difícil interpretación de la medida si el ión a determinar está prácticamente complejado, y el hecho de que son sensibles a la actividad iónica solo en la inmediata vecindad de la membrana. Dentro de esta técnica se distinguen los distintos tipos de medidas^{36,37,38} que corresponden a: electrodos redox, electrodo de vidrio, electrodos selectivos de iones y redisolución potenciométrica.

▪ *Culombimetría*

La culombimetría por inyección en flujo (FIC) está basada en la medida de la integral del pico corriente-tiempo (i-t) obtenido en la inyección de un pequeño volumen de disolución que contiene especies electroactivas, en un flujo de electrolito-soporte que pasa a través de un detector que opera en condiciones de transporte de masa limitado^{39,40,41}. Esta técnica es más efectiva cuando el electrodo tiene una gran superficie y pequeño volumen interno, llamándose entonces “electrodo coulométrico”. El aporte de reactivo en esta técnica puede realizarse por generación electrolítica externa, lo que tiene un amplio campo de aplicación, especialmente cuando el reactivo se inyecta en la disolución, o por un proceso de electrolisis continuo.

³⁴ S. Pati, M. Quinto, F. Palmisano, *Analytica Chimica Acta* 594 (2007) 234-239.

³⁵ N. Miyayoshi, N. Sato, S. Nakakita, W. Sumiyoshi, K. Morimoto, H. Okuma, M. Tokuda, K. Izumori, E. Watanabe, J. Hirabayashi, *Biosensors and Bioelectronics* 23 (2008) 1347-1352.

³⁶ R. de Marco, B. Pejčić, M. Loan, M. Wilcox, *Talanta* 57 (2002) 115-121.

³⁷ A.P.S. Paim, C.M.N.V. Almeida, B.F. Reis, R.A.S. Lapa, E.A.G. Zagatto, J.L.F. Costa Lima, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 28 (2002) 1221-1225.

³⁸ M.N. Abbas, A.A. Radwan, *Talanta* 74 (2008) 1113-1121.

³⁹ R.E. Gyurcsányi, Z. Fehér, G. Nagy, *Talanta* 47 (1998) 1021-1031.

⁴⁰ Z.K. He, B. Fuhrmann, U. Spohn, *Analytical Biochemistry* 283 (2000) 166-174.

⁴¹ P. Norouzi, S. Shirvani-Arani, P. Daneshgar, M.R. Ganjali, *Biosensors and Bioelectronics* 22 (2007) 1068-1074.

- *Conductimetría*

La asociación de la conductimetría con el FIA^{42,43} ha dado lugar a un nuevo método de inyección en flujo, donde las muestras se eluyen a través de una célula de conductividad miniaturizada. Una columna de cambio iónico reduce la contribución a la conductividad del ácido o la base por neutralización. La conductividad diferencial es, por tanto, proporcional al contenido de ácido o base, no considerando la sal.

2.3. Características analíticas de los métodos FIA

2.3.1. Sensibilidad

En general los métodos FIA son algo menos sensibles que los correspondientes métodos manuales convencionales por dos razones: cuando se hacen reacciones derivatizadoras, al ser el tiempo de reacción corto, se consiguen rendimientos parciales de reacción; la segunda razón radica en el hecho de que al existir una dispersión física o dilución de la muestra en el portador no se alcanza la máxima señal posible (bolo sin diluir). Son muchas las modificaciones que pueden hacerse en los montajes FIA para paliar esta disminución en la sensibilidad.

- El empleo de un soporte sólido que permita la retención-preconcentración del analito, o una especie derivada del mismo, a partir del bolo de muestra (esta alternativa es la que se ha elegido para el desarrollo de los sensores descritos en esta Memoria).
- El empleo de sistemas continuos de separación incorporados a la metodología FIA puede mejorar indirectamente la sensibilidad de la determinación.
- La interrupción del flujo cuando el bolo reaccionante se encuentra en el reactor permite el desarrollo de la reacción sin que se produzca dilución.
- La utilización de un punto de confluencia entre un canal de disolvente puro, que recibe al bolo de muestra, y el canal de reactivo, para conseguir una mezcla más eficiente entre el bolo de muestra y el reactivo.

2.3.2. Selectividad

La adaptación de un método convencional a la metodología FIA conlleva, en general, una reducción más o menos notable del número de especies interferentes y un aumento del nivel de

⁴² K. Grudpan, P. Sritharathikhun, J. Jakmunee, *Analytica Chimica Acta* 363 (1998) 199-202.

⁴³ G. Altiokka, N.O. Can, H.Y. Aboul-Enein, *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies* 30 (2007) 1333-1341.

tolerancia. Este hecho se ha constatado en numerosas determinaciones FIA al establecer la comparación con el respectivo método manual. El mayor nivel de selectividad logrado se debe en muchos casos a que las reacciones paralelas indeseables no se desarrollan en el corto espacio de tiempo de medida (tiempo de residencia en FIA).

Por otra parte, la introducción de un soporte sólido en el área de detección y la consiguiente retención del analito sobre aquel, origina un notable incremento en la selectividad debido a la exclusión de muchos de los componentes de la matriz.

2.3.3. Precisión

A pesar de que en la metodología FIA concurren aspectos cinéticos, físicos y químicos, que a priori pueden hacer suponer que los resultados no han de caracterizarse por una buena precisión, se alcanzan niveles de reproducibilidad muy notables y perfectamente comparables con los conseguidos con las metodologías manuales. A pesar de que son varias las causas que pueden ocasionar fluctuaciones en la señal FIA (modo de inyección, fluctuaciones de la temperatura, cambios en la concentración de reactivo o portador, etc.), es sin duda la constancia en el caudal el factor más crítico. Es importante pues elegir un sistema de propulsión que origine caudales constantes y reproducibles.

2.3.4. Tiempo de análisis

La frecuencia o velocidad de muestreo en la metodología FIA es comparablemente superior con respecto a los métodos convencionales. Es indudable que factores tales como volumen de muestra, volumen interno del reactor y caudal son decisivos al establecer la velocidad de muestreo, debiendo elegir en cada caso las condiciones adecuadas a las necesidades.

2.3.5. Sencillez

La metodología FIA se caracteriza por su gran simplicidad debido a:

- Montajes no sofisticados compuestos por tubos de teflón, conexiones, bifurcaciones, etc., de fácil ensamblaje, en contraste con las nuevas metodologías analíticas surgidas en los últimos años que se basan en instrumentos complicados, difíciles de adquirir, poner a punto y mantener.
- Fácil manejo. No sólo es tarea sencilla el uso de un montaje FIA para análisis de rutina, sino que es muy fácil también manipular su diseño para conseguir los resultados deseados. Así, es fácil sustituir algún componente, alargar un reactor, modificar la temperatura, etc.,

para adaptar el mismo montaje a la determinación de diversos analitos en diferentes matrices.

2.3.6. Economía y versatilidad

Al ser el FIA una metodología sencilla y simple, se caracteriza por su bajo coste, en claro contraste con otras metodologías automáticas, tanto de flujo continuo segmentado, como de flujo discontinuo. Además, el carácter modular de un sistema FIA permite su fácil adaptación a las diferentes necesidades. La sustitución de cualquiera de sus componentes y la incorporación de otros es tarea sencilla si se tiene en cuenta la ausencia de altas presiones que complicarían estas operaciones. La optimización de un nuevo montaje preparado en pocos minutos es fácil de llevar a cabo a diferencia de otros sistemas automáticos de análisis

3. Otras metodologías de análisis por inyección en flujo

Hoy en día los esfuerzos de investigación dedicados al desarrollo de nuevas metodologías de análisis en flujo constituyen un área investigadora muy prometedora, la cual se encarga de la puesta a punto de procedimientos de análisis muy simples y económicos con notables características analíticas. En este sentido, los métodos de análisis en flujo que están tomando protagonismo en los últimos años, junto con FIA, son SIA y MCFIA.

3.1. Análisis por Inyección Secuencial (SIA)

Ruzicka y Marshall introdujeron en 1990 otro tipo de sistemas de flujo no segmentado diferente al FIA, el SIA⁴⁴, considerado como la segunda generación de las técnicas de flujo.

La parte fundamental de un sistema SIA consiste en una válvula de selección multi-posición, o multiválvula, que es la encargada de controlar la dirección del flujo de las disoluciones en el sistema. El sistema consta además de una jeringa de pistón que realiza la función de aspirar y propulsar las distintas disoluciones a través del sistema. Entre la jeringa y uno de los puertos de la válvula multi-posición se coloca un bucle (“holding coil”); de igual forma, se conectan tanto el detector como el resto de las disoluciones a través de los puertos necesarios de dicha válvula. Tanto el portador como las disoluciones de muestra y/o reactivo/s son aspiradas hacia la jeringa y/o el “holding coil”, para posteriormente ser impulsadas hacia el detector^{45,46}. En el caso de que sea necesaria una reacción, se emplearán los mismos tubos que en el resto del sistema enrollados en forma helicoidal para constituir un reactor que se coloca justo antes del detector. Como detector puede emplearse cualquiera de los citados anteriormente en el apartado dedicado a sistemas FIA^{47,48,49,50,51}. En la *Figura 1.6* se muestra el esquema general de un sistema SIA.

⁴⁴ J. Ruzicka, G.D. Marshall, *Analytica Chimica Acta* 237 (1990) 329-343.

⁴⁵ P. Solich, M. Polásek, J. Klimundová, J. Ruzicka, *TrAC-Trends in Analytical Chemistry* 23 (2004) 116-126.

⁴⁶ A. Economou, *TrAC-Trends in Analytical Chemistry* 24 (2005) 416-425.

⁴⁷ S.M.Z. Al Kindy, A. Al Wishahi, F.E.O. Suliman, *Talanta* 64 (2004) 1343-1350.

⁴⁸ A. Economou, P. Panoutsou, D.G. Themelis, *Analytica Chimica Acta* 572 (2006) 140-147.

⁴⁹ H. Lethanh, B. Lendl, *Analytica Chimica Acta* 422 (2000) 63-69.

⁵⁰ E.M.G. Santos, A.N. Araújo, C.M.C.M. Couto, M.C.B.S. Montenegro, A. Kejzlarová, P. Solich, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 36 (2004) 701-709.

⁵¹ W. Thanasarakhan, S. Liawruangrath, S. Wangkarn, B. Liawruangrath, *Talanta* 71 (2007) 1849-1855.

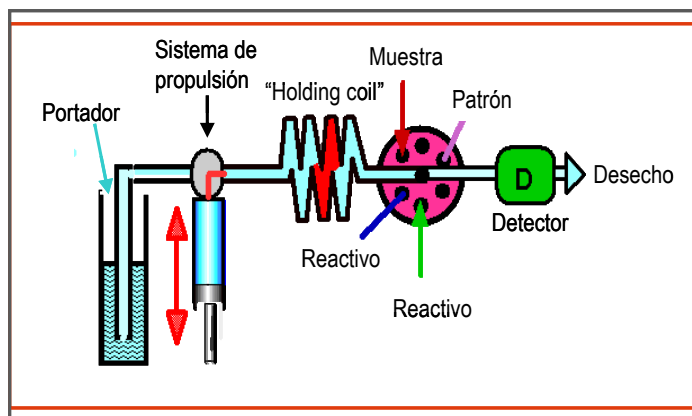


Figura I.6. Esquema general de un sistema SIA

➤ Comparación de SIA con FIA

Las ventajas que presenta el empleo de un sistema SIA frente a un sistema FIA son:

- La metodología SIA emplea un sistema más robusto y sencillo, utilizando sólo un canal incluso en el caso de necesitar llevar a cabo reacciones químicas, mientras que en FIA serían necesarios canales adicionales al emplear diferentes reactivos.
- Las bombas peristálticas multicanal empleadas en FIA son reemplazadas en SIA por bombas de jeringa, mucho más precisas y robustas.
- El consumo de muestra y reactivos decrece drásticamente al emplear sistemas SIA ya que, al contrario que en FIA, las disoluciones no están continuamente circulando a través del sistema.
- La configuración monocanal en SIA permite usar el mismo sistema para una gran diversidad de análisis o ensayos analíticos; por tanto, no es necesario modificar físicamente el sistema, al contrario de lo que sucede en FIA convencional.
- En SIA, el uso de la válvula multiposición proporciona una herramienta para realizar calibraciones automáticas, sin necesidad de cambiar el bucle de muestra.
- En los sistemas SIA todo el proceso es automáticamente controlado por medio de un software adecuado. De esta forma, es fácilmente programable la introducción de alícuotas de muestra y/o reactivos para conseguir una mayor homogeneización de las disoluciones en el caso de necesitarse una reacción química en el sistema.
- A diferencia de lo que ocurre en FIA, donde para la inserción de volúmenes diferentes de muestra es necesario modificar el bucle de la misma, en SIA se aspiran volúmenes

diferentes de muestra simplemente estableciendo el volumen requerido mediante el software que controla el sistema.

Como única desventaja, podría citarse el mayor tiempo necesario para el análisis al emplear SIA, disminuyendo, por consiguiente, la frecuencia de muestreo. Esto es debido a que es necesario aspirar en primer lugar las disoluciones antes de impulsirlas hacia el detector.

3.2. Multiconmutación (MCFIA)

Desde la introducción del FIA se han desarrollado diferentes procedimientos para la manipulación de disoluciones y el control de la dispersión de las mismas. Para la ejecución de estas tareas, se han diseñado ingeniosos montajes y dispositivos que permiten la introducción de manera reproducible de la disolución de muestra en el sistema en flujo. Estos dispositivos han ido evolucionando hasta culminar en la válvula rotatoria de seis puertos, actualmente el sistema de inyección más extendido en la metodología FIA. Sin embargo, esta válvula es un dispositivo que condiciona el diseño del montaje FIA, exige un consumo extra de muestra y además presenta dificultades en cuanto a su automatización. Estas y otras limitaciones pueden paliarse mediante el diseño de un sistema de flujo consistente en un conjunto de válvulas solenoide de tres puertos, actuando cada una de ellas como un conmutador independiente^{52,53}.

La versatilidad y aplicabilidad del MCFIA surgen como consecuencia de la mayor simplicidad y eficacia en el control de la dispersión de muestra y reactivos en comparación con la metodología FIA. La metodología MCFIA no es sólo una manera más elegante y automatizada de reproducir las estrategias que el FIA ha desarrollado desde 1975, sino que, bajo esta denominación se esconde un nuevo concepto de análisis en flujo, el cual engloba y amplía al FIA como precursor.

➤ Válvulas solenoide

Con la válvula rotatoria de seis puertos, utilizada en FIA, sólo es posible introducir el volumen de muestra correspondiente al bucle instalado; la introducción de un volumen distinto exige reemplazar la longitud del mismo, con la consiguiente interrupción del flujo y consumo de tiempo^{52,53}. Por lo tanto, los volúmenes de muestra a inyectar en FIA están estrictamente limitados: los volúmenes más pequeños insertables corresponden al volumen interno de la válvula, que suele ser de aproximadamente decenas de microlitros, y para volúmenes grandes el perfil de dispersión

⁵² M. Catalá Icardo, J.V. García Mateo, J. Martínez Calatayud, *TrAC-Trends in Analytical Chemistry* 21 (2002) 366-378.

⁵³ F.R.P. Rocha, B.F. Reis, E.A.G. Zagatto, J.L.F.C. Lima, R.A.S. Lapa, J.L.M. Santos, *Analytica Chimica Acta* 468 (2002) 119-131.

impone restricciones, ya que la muestra se dispersa en el medio portador sólo a través de los extremos. Por consiguiente, volúmenes grandes no permitirán un mezclado eficiente de la zona central del bolo de muestra con el portador a menos que se prolonguen los tiempos de residencia mediante caudales bajos y reactores de gran longitud, siendo necesario un lavado del bucle después de cada inyección con un volumen adicional de muestra para limpiar las paredes del mismo que han sido bañadas con la disolución portadora.

Cuando se trabaja con MCFIA, normalmente se hace uso de válvulas solenoide⁵⁴, en donde el volumen de muestra a introducir se controla por el tiempo y el caudal. Comparado con los sistemas FIA, se sustituye la medida de los volúmenes de inserción por la de tiempos de inserción, lo que permite desarrollar métodos de muestreo basados en el tiempo y conseguir un sistema de flujo activo, versátil y de fácil reconfiguración. Por tanto, la incertidumbre asociada a las alícuotas de volúmenes de muestras está relacionada principalmente con la precisión en el control del tiempo de muestreo, siendo máxima la reproducibilidad si se emplean dispositivos electrónicos.

Las válvulas solenoide no solamente se han utilizado en los sistemas comentados anteriormente, sino que también se han utilizado en cromatografía de líquidos (HPLC) para la inserción de muestra, y entrada y salida de disolventes, en cromatografía de gases (GC) para la entrada o salida de aire, en espectrometría de masas (MS) para la introducción de disoluciones y en SIA como interfase entre un horno microondas para la digestión de la muestra y el montaje⁵⁵.

La implementación de una válvula de este tipo en un sistema en flujo presenta una estructura funcional controlada por el ordenador, como se muestra en la *Figura I.7*.

⁵⁴ B. Gómez-Taylor Corominas, Nuevos métodos de análisis en flujo (FIA y multiconmutación) aplicados a la determinación por quimioluminiscencia directa de fenoles y polifenoles, Universidad de Valencia, 2003.

⁵⁵ J.Y. Neira, N. Reyes, J.A. Nobrega, *Laboratory Robotics and Automation* 12 (2000) 246-252.

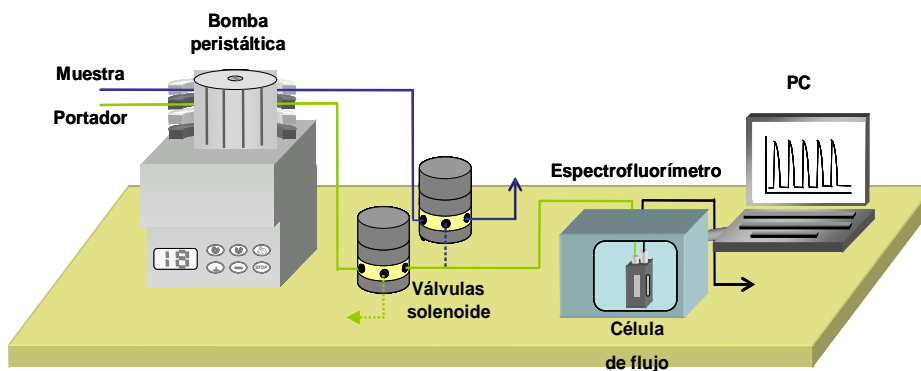


Figura I.7. Esquema de un sistema de flujo empleando válvulas solenoide de tres vías

En sistemas MCFIA que emplean distintas válvulas solenoide, estas actúan como un conmutador independiente controlado por un ordenador. Cada válvula puede adoptar dos posiciones distintas OFF y ON, permaneciendo en todo momento dos de los tres orificios de la válvula comunicados. En la *Figura I.8* se muestra esquemáticamente el funcionamiento de una válvula solenoide de tres vías para el caso en que esta controle el flujo del portador. En posición OFF, el solenoide que está conectado al generador está relajado y la armadura es empujada hacia abajo, circulando el portador hacia el detector. Sin embargo, en posición ON, se le transmite al solenoide una cierta cantidad de energía proporcional al pulso eléctrico y la armadura (en forma de T invertida) es atraída hacia arriba; de esta forma se bloquea la salida del portador hacia el detector, siendo así recirculado al recipiente correspondiente.

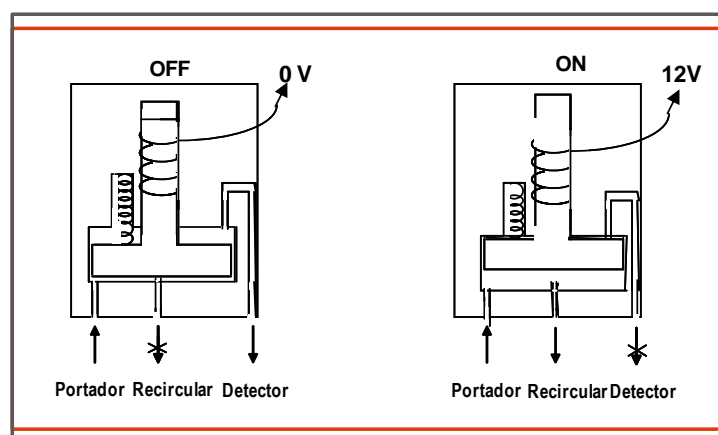


Figura I.8. Esquema del funcionamiento de la válvula solenoide de tres puertos

El volumen de muestra insertado es proporcional a la duración del pulso y puede modificarse alterando el perfil de la secuencia de inserción, siendo posible la inserción de un sólo segmento de muestra o de varios segmentos idénticos o de distintas longitudes alternados con

disolución portadora. La muestra es insertada en el sistema durante el tiempo que la válvula permanece activa (ON) y no es necesario un consumo adicional en tareas de lavado. Las microinserciones de pequeños segmentos de muestra “emparedados” entre microsegmentos de portador favorecen un mezclado íntimo de las disoluciones de muestra, portador y reactivos incluso cuando el volumen insertado es grande. Se trata pues de un sistema versátil que permite la inserción de volúmenes variables de muestra a través del *software* y garantiza la inserción reproducible de volúmenes de muestra de unos pocos microlitros mediante el control electrónico de la duración de los pulsos.

➤ Comparación de MCFIA con FIA

El empleo de pequeñas redes con nodos en forma de válvulas solenoide, actuando como conmutadores y controladas por un ordenador a través de un sencillo software, permite modificar la configuración del montaje (ciclos de apertura y cierre) sin necesidad de alterarlo físicamente ni manipularlo, ampliando enormemente las posibilidades analíticas del análisis en flujo. Las principales ventajas de la metodología MCFIA frente al FIA son:

- Miniaturización de los montajes en flujo. El reducido tamaño de las válvulas solenoide y de las interfases electrónicas permite el desarrollo de equipos integrados de reducido tamaño y de instrumentación portátil para efectuar análisis *in situ*.
- Disminución del consumo de muestra y reactivos. Esto es consecuencia de que las disoluciones no circulan continuamente a través del sistema.
- Aumento de la reproducibilidad. La intervención del operador es mínima (principal fuente de irreproducibilidad), ya que el proceso de inserción está controlado por un ordenador vía software. Por tanto, el MCFIA favorece el diseño de métodos de análisis completamente automáticos. Las configuraciones en MCFIA permiten que tanto la muestra como los reactivos sean microdispensados de forma muy precisa; volúmenes de unos pocos microlitros, correspondientes a fracciones de segundos de tiempos de inserción, pueden obtenerse de forma muy reproducible.
- Economía y sencillez. El precio de una válvula solenoide de tres puertos es inferior al de una válvula rotatoria convencional de las empleadas en FIA. Además el dispositivo para los ciclos de apertura y cierre de las válvulas solenoide sólo necesita un impulso eléctrico (12 V y 100 mA como valores de referencia).

- Versatilidad. A diferencia de la metodología FIA, la multiconmutación permite alterar todas las variables que inciden directamente en los perfiles de dispersión sin necesidad de modificar físicamente el montaje (volúmenes de muestra insertados, tiempos de reacción, etc.). La reconfiguración del mismo se lleva a cabo más fácilmente que en los sistemas FIA ya que basta únicamente con reprogramar la duración de los impulsos eléctricos que controlan la apertura y cierre de las válvulas o modificar la secuencia de conmutación de las mismas.
- Ampliación de las modalidades de análisis en flujo. El “control electrónico” de la dispersión (mejor control espacio-temporal de la dispersión frente al FIA) y la mayor versatilidad asociada a los sistemas MCFIA han permitido la implementación de modalidades de gradiente (flujo detenido, confluencia de zonas, penetración de zonas, muestreo de zonas), de procedimientos automáticos para determinaciones multiparamétricas y de montajes multicanal complejos que pueden ser manipulados de forma simple y eficaz.

A pesar de estas importantes ventajas, el MCFIA presenta algunas limitaciones o desventajas frente al FIA:

- Limitaciones en los volúmenes de inserción. Si los segmentos de muestra y reactivos introducidos son muy pequeños se hace necesario sincronizar la unidad de bombeo y las microinserciones para evitar problemas de irreproducibilidad.
- Inserción de muestra y reactivos. Debido a que las válvulas solenoide actúan como un conmutador entre las posiciones ON-OFF, una de las dos posiciones de entrada o salida de las válvulas queda cegada, quedando interrumpido el flujo por ese canal; ello obliga a emplazar en algunas ocasiones la unidad de bombeo después de las válvulas y a aspirar muestra y reactivos en vez de ser bombeados, aumentando de esta manera la irreproducibilidad del caudal. No obstante, una sencilla combinación de las válvulas solenoide permite el emplazamiento clásico de la bomba antes de los puntos de inserción.
- Comercialización de equipos. La no disponibilidad comercial de los equipos (interfases electrónicas y software para el control de las válvulas solenoide) se pone de manifiesto en el hecho de que prácticamente la totalidad de los trabajos publicados relacionados con MCFIA hacen uso de *hardware* y *software* de fabricación propia. No obstante, la sencillez de ambos elementos permite la posibilidad de desarrollarlos sin excesiva dificultad.

- Mayor desgaste de la válvula solenoide. En el caso del empleo de un soporte sólido en el sistema de flujo se produce una cierta sobrepresión, que se hace más patente al emplear válvulas solenoide. Esta sobrepresión da lugar a que las válvulas solenoide se estropeen antes que las válvulas rotatorias, siendo necesario su reemplazo con más frecuencia. Aun así, hay que destacar que el desgaste de las válvulas es mínimo, y esta desventaja es menor aún si cabe al comparar el precio de las válvulas rotatorias con el de las válvulas solenoide.

4. Optosensores en flujo continuo

4.1. Integración de la Espectroscopía en Fase Sólida (SPS) y el Análisis por Inyección en Flujo (FIA)

La SPS surge como intento de aplicación al análisis cuantitativo del fundamento de los “resin spot tests” (ensayos a la gota sobre resinas intercambiadores de iones). Esta técnica consiste en ensayos cualitativos de observación visual basados en la aparición de coloración en unos granos de resina de cambio iónico debido a la fijación en ella del producto de reacción del analito con los reactivos, que debe ser una especie cargada eléctricamente. A pesar de los numerosos trabajos sobre “resin spot tests” publicados desde que en 1954 Fujimoto^{56,57} propusiera la referida técnica de microanálisis cualitativo, en ninguno de ellos se hizo un intento de cuantificación del analito y tuvieron que pasar más de dos décadas hasta que en 1976 Kazuhisa Yoshimura¹ diera a conocer los primeros métodos de determinación cuantitativa basados en la medida directa de la absorbancia de la especie coloreada sorbida en fase resina, que él llamó *colorimetría de cambio iónico* y que actualmente suele denominarse *SPS*.

La SPS es una metodología relativamente nueva que ha sido aplicada a una gran variedad de analitos orgánicos^{58,59} e inorgánicos^{2,60} y que ha mostrado además una gran aplicabilidad en el análisis de muestras reales. Esta metodología se basa en el uso combinado de un soporte sólido para preconcentrar el analito (o su producto de reacción) con la medida directa de la absorción de radiación de la especie de interés retenida sobre el mencionado soporte sólido. Una vez retenida la especie de interés sobre la fase sólida, ésta es separada del resto de la disolución por filtración y trasvasada a una cubeta (generalmente de 1 mm de paso óptico) donde se lleva a cabo la detección espectroscópica.

Una gran ventaja de la SPS es la elevada sensibilidad que se consigue, pudiendo aplicarse al análisis de elementos traza sin la necesidad de realizar pasos previos de preconcentración, como en el caso de la espectroscopía convencional. Por otra parte, es interesante destacar la elevada selectividad obtenida con esta metodología, debido a la retención selectiva del analito (o su

⁵⁶ M. Fujimoto, Bulletin Chemical Society of Japan 27 (1954) 48-50.

⁵⁷ M. Fujimoto, Bulletin of Chemical Society of Japan 27 (1954) 347-350.

⁵⁸ A. Ruiz-Medina, M.L. Fernández-de Córdova, P. Ortega-Barrales, A. Molina-Díaz, International Journal of Pharmaceutics 216 (2001) 95-104.

⁵⁹ A. Ruiz-Medina, M.L. Fernández-de Córdova, A. Molina-Díaz, Fresenius' Journal of Analytical Chemistry 363 (1999) 265-269.

⁶⁰ J. Díaz-García, J.M. Costa-Fernández, N. Bordel, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, Analytica Chimica Acta 486 (2003) 1-10.

producto de reacción) sobre el soporte sólido, así como la sencillez de la técnica y el bajo coste de la instrumentación que requiere.

Inicialmente la técnica se aplicó a un amplio conjunto de elementos y compuestos^{4,61,62,63}, y más tarde se expandió el abanico de posibilidades que presenta dicha técnica cuando se introdujo la fluorimetría como método de detección^{64,65}. Posteriormente la SPS se combinó con el FIA incorporando el sólido activo a una célula de flujo. Surgen así los sensores ópticos en flujo (flow-through sensors) propuestos por Ruzicka y Hansen⁵. Estos sistemas también denominados optosensores en flujo continuo, pueden integrar simultáneamente la detección con la reacción y la separación en la propia célula de medida. Se muestra un esquema de la implementación de ambas metodologías en la *Figura I.9*.

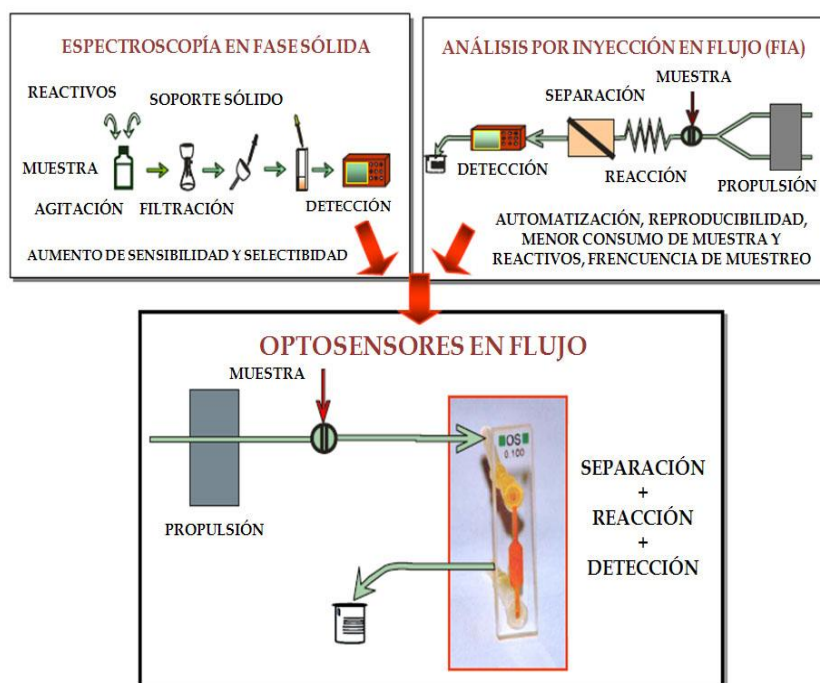


Figura I.9. Integración de la SPS con el FIA: optosensores en flujo continuo

⁶¹ C.A. Heller, R.R. McBride, M.W.A. Ronning, *Analytical Chemistry* 49 (1977) 2251-2253.

⁶² A. Ruiz-Medina, M.L. Fernández-de Córdova, A. Molina-Díaz, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 20 (1999) 247-254.

⁶³ A. Molina-Díaz, J.M. Herrador-Mariscal, M.I. Pascual-Reguera, L.F. Capitán-Vallvey, *Talanta* 40 (1993) 1059-1066.

⁶⁴ J.L. Vílchez, M. del Olmo, R. Avidad, L.F. Capitán-Vallvey, *The Analyst* 119 (1994) 1211-1214.

⁶⁵ O. Ballesteros, J.L. Vílchez, A. Navalón, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 30 (2002) 1103-1110.

4.2. Fundamento de los optosensores en flujo continuo

Un sensor químico (o bioquímico) ideal puede definirse como un dispositivo analítico (miniaturizado) que responde de manera directa, reversible, continua, rápida, exacta y precisa a los cambios de concentración de una (o más) especie(s) de una muestra⁶⁶. Consta de una microzona sensora, donde tiene lugar una reacción química (o bioquímica) y/o un proceso de separación, que está conectada con (o integrada en) un transductor, que en el caso de los optosensores se trata de un transductor óptico. La amplia variedad existente de sensores hace difícil describir su comportamiento en términos generales; no obstante, establecer sus propiedades genéricas, indispensables unas, deseables otras, resulta mucho más fácil. Algunas de ellas coinciden con características esenciales de la metodología FIA, como son exactitud, precisión, sensibilidad y selectividad; otras, se refieren al tipo de funcionamiento: reversibilidad y reutilizabilidad en procesos irreversibles o regenerables. Otras características básicas son aquellas relacionadas con el tiempo: respuesta lo más próxima posible a tiempo real y rapidez en los procesos reversibles y en los de regeneración y estabilidad (duración y tiempo de vida operacional). También cabe destacar su simplicidad de construcción y operación, robustez, bajo coste y posibilidad de utilización con muestras complejas o sistemas en evolución.

Los optosensores en flujo continuo son compatibles con detectores espectroscópicos moleculares. El bolo de muestra es insertado en la corriente de portador y la radiación interacciona directamente con la zona sensora integrada en el área de detección. Estos sistemas proporcionan una respuesta rápida, reversible y continua que es transducida vía un detector espectroscópico molecular no destructivo.

4.2.1. Señal analítica en optosensores espectrofotométricos

La señal analítica medida en los optosensores en flujo continuo está directamente relacionada con la concentración de analito de la muestra inyectada. La absorbancia (en realidad atenuación) \mathbf{A} , medida sobre el soporte sólido consta de varios componentes⁶⁷:

$$\mathbf{A} = \mathbf{A}_A + \mathbf{A}_R + \mathbf{A}_S \quad (1)$$

donde,

\mathbf{A}_A = absorbancia del analito o su derivado retenido en el sólido.

⁶⁶ M. Valcárcel, M.D. Luque de Castro, *The Analyst* 118 (1993) 593-600.

⁶⁷ A. Molina-Díaz, A. Ruiz-Medina, M.L. Fernández-de Córdova, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 28 (2002) 399-419.

A_R = absorbancia del sólido (soporte sólido + reactivo, si lo hay).

A_S = absorbancia de la solución intersticial entre las partículas del sólido (puede ser despreciada, generalmente, frente a los otros términos).

El empaquetamiento de las partículas del sólido activo afecta a los valores de los términos del segundo miembro de la ecuación (1). Sin embargo, cuando el flujo está circulando unos cuantos segundos, el empaquetamiento es fijo (constante) y la línea base muestra un valor constante, igual a $A_R + A_S \approx A_R$. Por tanto el pico obtenido al paso del analito A_A corresponde a la diferencia entre el valor experimental medido A y $A_R + A_S$. De esta forma, la señal analítica de estos sistemas puede obtenerse directamente midiendo a una sola longitud de onda, y pueden llevarse a cabo reiteradas medidas sobre el mismo empaquetamiento del sólido. Sin embargo, en SPS en modo discontinuo, cada medida se efectúa sobre diferentes lotes de sólido empaquetado en la célula, con lo que el empaquetamiento es diferente en cada caso, lo que origina valores de A_A no reproducibles si se mide a una sola longitud de onda. Por ello, en SPS manual se necesita efectuar las medidas a dos longitudes de onda (una en el máximo de absorción y otra donde sólo el soporte sólido absorbe luz) para eliminar el efecto de la variabilidad en el empaquetamiento.

La absorbancia neta del analito viene dada por

$$A_A = \epsilon_R I_R C_R$$

donde

ϵ_R = absorptividad molar aparente del analito en la fase sólida tal como se observa en el sistema de flujo ($\text{kg mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$).

I_R = longitud media de paso óptico (cm).

C_R = concentración de analito en la fase sólida (mol kg^{-1}).

Cuando se inyectan en el sistema V (L) de una muestra conteniendo una concentración C_0 (mol L^{-1}) de analito, la concentración sobre la fase sólida (C_R , mol kg^{-1}) será:

$$C_R = C_0 V / m_r$$

(m_r = masa de soporte sólido, kg) suponiendo un valor alto del coeficiente de distribución (como suele ser lo habitual). Por tanto,

$$A_A = \epsilon_R I_R V C_0 / m_r$$

Por consiguiente, manteniendo V constante, existe una relación lineal entre la señal analítica y la concentración inicial, C_0 , del analito en la solución de muestra inyectada, siendo $\epsilon_R l_R V / m_r$ la pendiente de la recta de calibración. De esta ecuación se desprende una importante característica de estos optosensores en flujo: manteniendo C_0 constante, A_A crece conforme crece V . Por tanto, cabe esperar una relación lineal entre A_A y el volumen de muestra inyectado, es decir, la sensibilidad es proporcional al volumen de muestra usado para el análisis y, por tanto, puede incrementarse aumentando éste. Esto se cumple en un intervalo de valores de V (hasta, generalmente, unos 1500-2000 μL), por encima del cual la señal tiende a estabilizarse.

Además, la cantidad de soporte sólido a usar, m_r , debe ser la mínima posible que permita la geometría de la célula y el diseño del haz del detector, pues la señal, de acuerdo con las ecuaciones anteriores, es inversamente proporcional a la cantidad de soporte sólido empleado.

4.2.2. Señal analítica en optosensores luminiscentes

En el caso de los optosensores fluorimétricos puede encontrarse una relación similar entre la señal analítica y la concentración de analito en la solución problema a la obtenida en los optosensores espectrofotométricos. La señal de fluorescencia, I , de la especie de interés retenida en el soporte sólido viene dada por la siguiente expresión⁶⁷:

$$I = 2,303[(1/1+Sb)]\Phi_F I_0 \epsilon_R l_R C_R$$

Φ_F = rendimiento cuántico de fluorescencia.

I_0 = intensidad del haz de excitación.

ϵ_R, l_R, C_R se definen del mismo modo que en optosensores espectrofotométricos.

S = coeficiente de dispersión (fracción de radiación dispersada por unidad de espesor del soporte sólido).

b = espesor del soporte.

Por tanto,
$$I = 2,303[(1/1+Sb)]\Phi_F I_0 \epsilon_R l_R V C_0 / m_r$$

De esta ecuación, se puede deducir que la señal de fluorescencia y la concentración de la especie de interés también están directamente relacionadas y el efecto del volumen de muestra es similar al caso de los optosensores espectrofotométricos. De forma análoga, la señal analítica es inversamente proporcional a la cantidad de soporte sólido utilizado.

Relaciones similares de proporcionalidad entre la señal y la concentración de la especie de interés pueden encontrarse para optosensores basados en fosforescencia, CL y LSL.

4.3. Componentes de los optosensores en flujo continuo

Los elementos de estos dispositivos son los propios de un sistema FIA (sistemas de propulsión, inyección, transporte, y detección). La única diferencia, en principio, con respecto a un sistema FIA convencional, es la presencia de soporte sólido en la célula de flujo, donde se llevan a cabo las medidas espectroscópicas. Estos dos elementos, junto con las técnicas de detección, serán explicados a continuación.

4.3.1. Soportes sólidos

El soporte sólido constituye una parte esencial en un optosensor en flujo continuo, ya que sobre la superficie del mismo se va a producir la integración de reacción y/o retención y la detección. Un aspecto importante en el que difiere de la SPS llevada a cabo en modo *batch* es la reutilización sucesiva del soporte sólido durante amplio número de medidas. Unos pocos miligramos de partículas se pueden reutilizar cientos de veces, disminuyendo además drásticamente la cantidad de soporte sólido por determinación. No obstante, algunas veces se hace necesario reemplazarlo después de un cierto número de análisis debido a la desactivación de la superficie sensora tras su uso repetido (por ejemplo en matrices complejas), reduciendo de esta manera su tiempo de vida.

El soporte sólido empleado debe reunir ciertos requisitos:

- El tamaño de las partículas debe ser adecuado (entre 40 y 120 μm generalmente), ya que tamaños de partícula menores podrían generar sobrepresiones en el sistema.
- El material escogido debe ser químicamente inerte a los componentes de las soluciones del flujo y resistente al flujo continuo, garantizando reproducibilidad en la respuesta del sensor.
- El proceso de retención/elución debe ser suficientemente rápido.
- Debe ser compatible con el sistema de detección usado (por ejemplo, en los sensores fotométricos, la absorción de fondo debe ser suficientemente baja para permitir realizar las medidas sin saturar el detector).

Los tres tipos de materiales más usados son:

- *Polímeros de intercambio iónico*

Polímeros de matriz aromática hidrofóbica (estireno/divinilbenceno) y polímeros de povidexano suelen ser los más utilizados. Los segundos son más transparentes y permiten medir en la región ultravioleta, mientras los de matriz aromática poseen fondos de absorción muy altos en la región ultravioleta y sólo pueden usarse en la región visible. Las resinas Dowex (*Figura I.10*) son las más representativas de los primeros y los geles Sephadex (QAE A-25, CMC-25 y SPC-25) de los segundos (*Figura I.11*). El proceso de retención es por intercambio iónico.

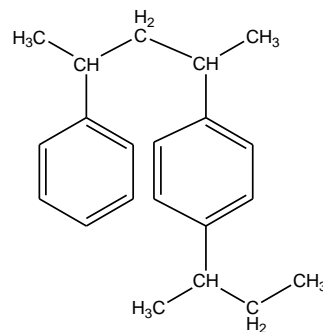


Figura I.10. Estructura básica de las resinas de tipo Dowex.

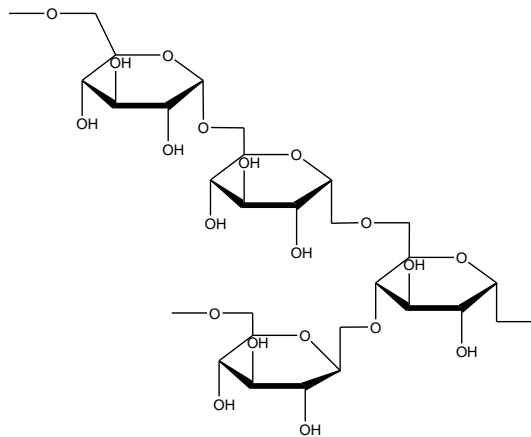


Figura I.11. Esquema del esqueleto de polisacárido de los polímeros de dextrano

- *Polímeros adsorbentes sin grupos funcionales*

Son resinas adsorbentes contituidas por cadenas de poliestireno entrecruzadas mediante moléculas de divinilbenceno (al igual que las resinas tipo Dowex), pero carentes de grupos funcionales cambiadores de iones. En este grupo se incluyen las resinas macroporosas tipo Amberlita XAD. Son capaces de retener gran cantidad de reactivos aromáticos por adsorción; de

este modo los grupos activos de dichos reactivos quedan libres y no pierden su capacidad de complejación. Generalmente se emplean en los sensores luminiscentes, dada su alta absorción de fondo tanto en el visible como en el ultravioleta.

▪ *Sólidos adsorbentes no polares*

Son soportes constituidos por microesferas de sílice que poseen cadenas lineales hidrocarbonadas enlazadas a los grupos silanol exteriores. La cadena suele ser de 2, 8 ó 18 átomos de carbono. Son materiales no porosos por lo que presentan gran resistencia a los cambios físico-químicos del medio. Uno de los soportes sólidos más utilizados es el gel de sílice C₁₈, de naturaleza hidrófoba, que presenta un mecanismo de naturaleza adsortiva.

Son soportes extremadamente útiles para la retención de compuestos orgánicos, ya que los retienen débilmente en medio acuoso o hidro-orgánico, y la elución puede conseguirse fácilmente aumentando el porcentaje de disolvente orgánico del medio. No obstante, hay que tener en cuenta que son menos selectivos que los cambiadores iónicos.

▪ *Otras fases sensoras*

Además de estos soportes sólidos se han descrito optosensores con otro tipo de fases sensoras como ciclodextrinas inmovilizadas en gel de sílice⁶⁸, vidrio de tamaño de poro controlado (GPC)⁶⁹, materiales de procesos sol-gel⁷⁰ y polímeros de impresión molecular (MIPs)⁷¹.

Los MIPs son materiales macroporosos con puntos de unión selectivos capaces de reconocer a una determinada molécula. Son diversos los usos que se han dado hasta ahora a estos polímeros. Estos materiales son capaces de simular, en términos de afinidad y selectividad, los anticuerpos y/o enzimas sintetizados por los sistemas biológicos. El uso de MIPs en sensores ópticos está aun en su infancia a pesar de la creciente atención que viene recibiendo en los últimos años^{71,72}.

⁶⁸ Z. Gong, Z. Zhang, Fresenius' Journal of Analytical Chemistry 360 (1998) 138-140.

⁶⁹ P. Van Zoonen, D.A. Kamminga, C. Gooijer, N.H. Velthorst, R.W. Frei, G. Gübitz, Analytica Chimica Acta 174 (1985) 151-161.

⁷⁰ J.M. Costa-Fernández, M.E. Díaz-García, A. Sanz-Medel, Analytica Chimica Acta 360 (1998) 17-26.

⁷¹ I. Sánchez-Barragán, K. Karim, J.M. Costa-Fernández, S.A. Piletsky, A. Sanz-Medel, Sensors and Actuators, B: Chemical 123 (2007) 798-804.

⁷² S. Al Kindy, R. Badía, J.L. Suárez-Rodríguez, M.E. Díaz-García, Critical Reviews in Analytical Chemistry 30 (2000) 291-309.

4.3.2. Células de flujo

La célula de flujo es una parte esencial en el diseño de optosensores en flujo continuo, puesto que contendrá la fase sólida en la que se produce la preconcentración y separación de los analitos, integrada con la detección. Una característica importante es el paso óptico que tiene que recorrer la radiación para atravesar dicha célula y que como norma general, no debe ser superior a 2 mm para evitar que la intensidad relativa de luminiscencia de la línea base sea demasiado alta. Por otra parte, el depósito interno de la célula de flujo, que ha de albergar el soporte sensor, debe ser lo menor posible con objeto de incrementar la sensibilidad, puesto que una gran cantidad de soporte sólido reduce la preconcentración de los analitos aumentando además el tiempo de elución. De igual forma, es importante tener en cuenta el sistema de detección que se va a emplear en cada caso, lo que condicionará la estructura geométrica de la célula de flujo.

Por otra parte el nivel de sólido en la célula es una variable clave. La célula debe llenarse hasta una altura tal que el haz de luz incida completamente sobre el soporte sólido y sin que éste apenas llegue a exceder el límite superior del haz de luz; pues alturas crecientes a partir de este límite originan la fijación de la especie de interés por encima del haz (fuera de la zona de detección) o bien una dispersión del bolo de muestra a lo largo de una mayor cantidad de sólido, con pérdida de sensibilidad y disminución de frecuencia de muestreo. Niveles más bajos del indicado producen una disminución de la señal, pues la luz pasa total o parcialmente a través del flujo de solución. En definitiva, la parte superior del sólido debe mantenerse tan próxima al límite superior del haz como sea posible, pero por encima de él.

4.3.3. Técnicas de detección

En los optosensores en flujo continuo se han empleado distintas técnicas de detección. A continuación, se comentan las más empleadas.

- *Espectrofotometría UV-visible*

Constituye una de las técnicas más empleadas para el desarrollo de optosensores en flujo. Los primeros optosensores en flujo descritos estaban basados en espectrofotometría visible, y fueron aplicados a la determinación de metales mediante la formación y retención de complejos coloreados. Posteriormente, se desarrollaron optosensores en flujo de este tipo para el análisis de compuestos orgánicos. Existe un gran número de ejemplos de aplicaciones de optosensores UV especialmente para el análisis de principios activos en productos farmacéuticos⁶⁷.

Aunque la espectrofotometría UV-visible adolece de escasa selectividad en el caso de su uso convencional en disoluciones homogéneas, el empleo de un soporte sólido activo para la retención de la especie de interés mejora sensiblemente aquella selectividad.

▪ *Luminiscencia molecular*

✓ *Fluorescencia Molecular*

La fluorescencia molecular es la fotoluminiscencia de tiempo de vida corto procedente de un singlete excitado. La detección fluorescente presenta muchas ventajas, como alta selectividad y sensibilidad, bajo límite de detección, capacidad para la miniaturización y bajo coste, por lo que ha sido ampliamente utilizada y aplicada al desarrollo de optosensores^{67,73,74}. Uno de sus inconvenientes es el pequeño número de especies que manifiesta efecto fluorescente⁷⁵, aunque puede ampliarse el campo de aplicación mediante el uso de reacciones químicas sencillas⁷⁶ o de PIF^{77,78}. Esta última técnica está basada en la conversión de analitos no fluorescentes o débilmente fluorescentes en fotoproductos fuertemente fluorescentes mediante el empleo de fotones, no siendo necesario un sistema de mezcla. Por tanto el sistema de inyección en flujo se simplifica, ya que el montaje que se requiere para desarrollar este tipo de reacciones es muy sencillo y se reduce el consumo de reactivos.

Para que se produzca una fotorreacción en la que se generen compuestos fluorescentes a partir de analitos que no lo son, o lo son débilmente, se deben cumplir una serie de requisitos:

- El analito debe absorber fuertemente en la región UV para iniciar la reacción fotoquímica.
- La radiación absorbida debe ser de una longitud de onda que no sea absorbida significativamente por el (los) fotoproducto(s).
- Deberá haber un aumento de la rigidez estructural o de la aromaticidad de los fotoproductos que de lugar a un aumento del coeficiente de absorción y a un rendimiento cuántico de fluorescencia mayores que los del analito.

⁷³ A. Domínguez-Vidal, P. Ortega-Barrales, A. Molina-Díaz, *Talanta* 56 (2002) 1005-1013.

⁷⁴ J.F. García-Reyes, P. Ortega-Barrales, A. Molina-Díaz, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52 (2004) 2197-2202.

⁷⁵ P. Solich, C.K. Polydorou, M.A. Koupparis, C.E. Efstathiou, *Analytica Chimica Acta* 438 (2001) 131-136.

⁷⁶ T. Pérez-Ruiz, C. Martínez-Lozano, A. Sanz, A. Guillén, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 34 (2004) 551-557.

⁷⁷ M. Sánchez Peña, F. Salinas, M.C. Mahedero, J.J. Aaron, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 10 (1992) 805-808.

⁷⁸ B. Laassis, J.J. Aaron, M.C. Mahedero, *Analytica Chimica Acta* 290 (1994) 27-33.

- Estabilidad química y térmica (en los casos en los que se lleve a cabo a una temperatura mayor que la ambiente) de los fotoproductos, al menos en el intervalo de tiempo necesario para su medida.
- Es deseable que el proceso de fotoconversión sea muy eficiente y tener un alto rendimiento fotoquímico.

La implementación del PIF en sistemas de flujo data de 1991, cuando Chen y col.^{79,80} desarrollaron dos métodos para análisis de fenotiazinas en fármacos. Sin embargo, la técnica PIF fue implementada por primera vez en un optosensor en flujo para la determinación de tiamina en presencia del resto de vitaminas del complejo B⁸¹. Desde entonces se han propuesto varios optosensores en flujo para la determinación de principios activos en fármacos, alimentos y fluidos biológicos y pesticidas en aguas y alimentos^{82,83,84,85}.

✓ Fosforescencia

Se caracteriza por ser una fotoluminiscencia de tiempo de vida largo procedente de un triplete excitado, formado por la absorción de radiación ultravioleta, visible o infrarroja cercana. Su empleo no es tan habitual como el de otras técnicas luminiscentes ya que se requieren condiciones muy concretas (trabajo a muy bajas temperaturas, medios organizados, metales pesados, lantánidos, etc) para su aplicación. A pesar de ello dicha técnica ha sido acoplada a sistemas FIA^{18,86}.

Se han descrito optosensores en flujo que emplean detección fosforescente para una gran variedad de analitos (contaminantes orgánicos, iones metálicos, sensores de humedad y pH, etc.)^{60,87}.

✓ Luminiscencia sensibilizada con lantánidos

La LSL está basada en las propiedades luminiscentes de iones lantánidos (Tb (III) y Eu (III), normalmente), que se ven incrementadas cuando interaccionan con distintas especies químicas orgánicas (fármacos, pesticidas, etc.). Los mencionados iones pueden formar quelatos o

⁷⁹ D. Chen, A. Ríos, M.D. Luque de Castro, M. Valcárcel, *Analyst* 116 (1991) 171-176.

⁸⁰ D. Chen, A. Ríos, M.D. Luque de Castro, M. Valcárcel, *Talanta* 38 (1991) 1227-1233.

⁸¹ J. López-Flores, M.L. Fernández-de Córdova, A. Molina-Díaz, *Analytica Chimica Acta* 535 (2005) 161-168.

⁸² J. López-Flores, M.L. Fernández-de Córdova, A. Molina Díaz, *Analytica Chimica Acta* 600 (2007) 164-171.

⁸³ J. López-Flores, A. Molina-Díaz, M.L. Fernández-de Córdova, *Analytica Chimica Acta* 585 (2007) 185-191.

⁸⁴ J. López-Flores, M.L. Fernández-de Córdova, A. Molina-Díaz, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 388 (2007) 1771-1777.

⁸⁵ J. López Flores, M.L. Fernández-de Córdova, A. Molina Díaz, *Journal of Environmental Monitoring* 11 (2009) 1080-1085.

⁸⁶ A. Salinas-Castillo, J.F. Fernández-Sánchez, A. Segura-Carretero, A. Fernández-Gutiérrez, *Pest Management Science* 61 (2005) 816-820.

⁸⁷ I. Sánchez-Barragán, J.M. Costa-Fernández, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, A. Salinas, A. Segura, A. Fernández-Gutiérrez, A. Ballesteros, J.M. González, *Analytical Chemistry* 77 (2005) 7005-7011.

complejos con ligandos orgánicos y producir transferencia de energía intramolecular a través del estado triplete del ligando a niveles de emisión del ion lantánido; es decir, la excitación se produce a la longitud de onda característica del compuesto orgánico (el analito) y la emisión se produce a la longitud de onda característica del lantánido^{88,89} (Figura I.12).

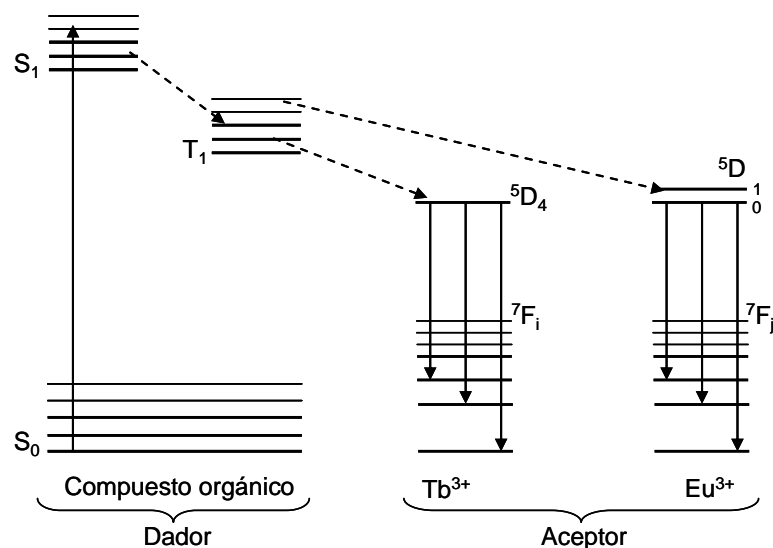


Figura I.12. Mecanismo de transferencia de energía LSL

Las principales ventajas de este proceso son un gran desplazamiento de Stokes, bandas de emisión muy estrechas y larga vida media de luminiscencia (lo que permite las medidas en el espectrofluorímetro en modo fosforescencia).

Esta mejora de la intensidad luminiscente que se consigue al formar este tipo de quelatos, permite el desarrollo de métodos muy sensibles. Por otro lado, el pequeño número de compuestos que pueden complejarse con los iones lantánidos hace que la selectividad de los métodos basados en este tipo de detección sea mayor que la correspondiente a medidas fluorimétricas convencionales.

Son bastante escasos los optosensores de este tipo encontrados en bibliografía, habiendo sido aplicados a la determinación de fármacos como tetraciclinas y antraciclinas mediante la monitorización de la emisión luminiscente de sus complejos con Eu (III)^{90,91,92}.

⁸⁸ N. Arnaud, J. Georges, Analyst 124 (1999) 1075-1078.

⁸⁹ M.P. Aguilar-Caballos, A. Gómez-Hens, D. Pérez-Bendito, Analyst 124 (1999) 1079-1084.

⁹⁰ F. Alava-Moreno, M.E. Díaz-García, A. Sanz-Medel, Analytica Chimica Acta 281 (1993) 637-644.

⁹¹ F. Alava-Moreno, M.J. Valencia-González, M.E. Díaz-García, Analyst 123 (1998) 151-154.

✓ *Quimioluminiscencia*

Es una técnica en la que la energía radiante que se produce es resultado de la relajación electrónica de un estado excitado a otro de menor energía (generalmente a un estado fundamental) tras una reacción química. Este fenómeno no es muy habitual, ya que la energía producida en una reacción química no suele ser tan elevada como para que este proceso tenga lugar, y la energía se disipa habitualmente en forma no radiante. Al igual que sucede en el caso de la fluorescencia y la fosforescencia, el proceso es el mismo, pero no es necesario el uso de fuentes de excitación, por lo que la instrumentación empleada se simplifica. Existe un número elevado de aplicaciones de métodos quimioluminiscentes en distintos campos, como el medioambiental⁹³, clínico⁹⁴ y farmacológico⁹⁵.

El uso analítico de la CL está experimentando un creciente interés en los últimos años, gracias a su elevada sensibilidad y selectividad, bajos límites de detección e intervalos dinámicos amplios. En 1985 fue descrito el primer optosensor en flujo con detección quimioluminiscente⁶⁹, basado en el empleo de luminol inmovilizado en un soporte sólido de vidrio de tamaño de poro controlado. A partir de entonces, se han desarrollado varios optosensores de este tipo principalmente para el análisis de fármacos^{96,97,98}.

▪ *Espectroscopía IR y Raman*

La espectroscopía vibracional es otra de las técnicas que se han implementado en el desarrollo de optosensores en flujo continuo, aunque su uso con fines analíticos cuantitativos es muy escaso. Solamente hay algunos ejemplos en la literatura que describen el empleo de espectroscopía NIR²³, MIR^{99,100,101} y SERS^{24,102}. Estas técnicas de detección pueden aportar información estructural de grupos específicos y característicos de los compuestos estudiados, y esto ha sido ya explorado en el estudio de azúcares, hidratos de carbono, ácidos orgánicos, etc. También

⁹² R.M. Cuenca-Trujillo, M. Ayora-Cañada, A. Molina-Díaz, *Journal of AOAC International* 85 (2002) 1268-1272.

⁹³ J.F. Huertas-Pérez, L. Gámiz-Gracia, A.M. García-Campaña, A. González-Casado, J.L. Martínez Vidal, *Talanta* 65 (2005) 980-985.

⁹⁴ L. Gámiz-Gracia, A.M. García-Campaña, F. Alés Barrero, L. Cuadros Rodríguez, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 377 (2003) 281-286.

⁹⁵ H. Cui, C.G. Xie, C.Z. Lai, *Luminescence* 18 (2003) 318-323.

⁹⁶ W. Qin, *Analytical Letters* 35 (2002) 2207-2220.

⁹⁷ Z. Zhang, S. Zhang, X. Zhang, *Analytica Chimica Acta* 541 (2005) 37-47.

⁹⁸ Y. Xiong, H. Zhou, Z. Zhang, D. He, C. He, *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 66 (2007) 341-346.

⁹⁹ M. Haberkorn, P. Hinsmann, B. Lendl, *Analyst* 127 (2002) 109-113.

¹⁰⁰ A. Perez-Ponce, B. Lendl, *Applied Spectroscopy* 54 (2000) 676-680.

¹⁰¹ B. Lendl, R. Schindler, *Vibrational Spectroscopy* 19 (1999) 1-10.

¹⁰² N. Weissenbacher, B. Lendl, J. Frank, H.D. Wanzenbock, R. Kellner, *Analyst* 123 (1998) 1057-1060.

se ha desarrollado un optosensor con detección por espectroscopía Raman para el análisis de antibióticos del grupo de las sulfonamidas¹⁰³.

4.4. Desarrollo de optosensores en flujo continuo: optimización de variables experimentales

En este apartado se describirán las distintas etapas y los distintos factores y variables que se tienen en cuenta a la hora de estudiar y desarrollar un optosensor en flujo continuo.

4.4.1. Variables de la unidad de retención/detección

El punto de partida en SPS es la elección de un soporte sólido adecuado donde fijar el/los compuesto/s de interés. La elección del soporte entre la gran variedad de materiales sintéticos y naturales que pueden emplearse constituye una parte esencial del diseño del sensor. Para la elección de este soporte hay que considerar la naturaleza, estructura y propiedades físicas y químicas de los analitos, reactivos o productos de reacción que vayamos a fijar en él, además de la transparencia del mismo en la zona del espectro en la que se trabaje, ya que no debe originarse una línea base demasiado alta.

En general, se suelen usar resinas de intercambio iónico cuando el analito (o producto de reacción) presenta un equilibrio ácido-base que permita que pueda estar cargado en un intervalo de pH determinado en función del valor de su pK_a . En el caso de que la molécula sea apolar o no presente grupos funcionales que permitan su retención en un intercambiador de iones, se usan soportes sólidos sin grupos funcionales donde la retención de la especie de interés se lleva a cabo mediante un mecanismo principalmente de adsorción. Por tanto, a la hora de seleccionar el soporte sólido es necesario prestar especial atención a variables químicas tales como el pH de la muestra o del portador, ya que pueden tener gran influencia en el comportamiento del analito en la fase sólida. A la hora de seleccionar un soporte sólido de entre varios que permiten la retención del analito (o especie de interés) se elegirá aquel que proporcione una mayor señal analítica y una fácil regeneración del mismo.

En el caso de los sensores monoparámetro sólo interesa la retención de un analito, por lo que se elegirá un soporte sólido de acuerdo con la naturaleza del mismo. Sin embargo, en los sensores multiparámetro será necesario seleccionar un soporte sólido que permita la retención todos los analitos.

¹⁰³ M.J. Ruedas-Rama, M. López-Sánchez, A. Ruiz-Medina, A. Molina-Díaz, M.J. Ayora-Cañada, *Analyst* 130 (2005) 1617-1623.

Como ya se dijo anteriormente, el soporte sólido debe cubrir completamente el área irradiada del detector. En ocasiones, una cantidad adicional de soporte sólido en la célula de flujo permite el desarrollo de optosensores para la determinación de varios analitos de forma simultánea mediante la separación de éstos en la propia célula de flujo.

Una vez seleccionado el soporte sólido se realizan los espectros de luminiscencia correspondientes al/los analito/s. Éstos se llevan a cabo tanto en disolución como en fase sólida. De esta forma se pueden establecer sus características espectrales y seleccionar las longitudes de onda de excitación y emisión óptimas para la medida.

4.4.2. Variables instrumentales

Debido a la presencia del soporte sólido en el detector, el ruido de fondo en los optosensores en flujo es generalmente alto, por lo que la optimización de las variables instrumentales es fundamental para poder medir el analito en un amplio rango de concentraciones. En optosensores con detección luminiscente las variables instrumentales a optimizar son la anchura de las rendijas de excitación y emisión y el voltaje del tubo fotomultiplicador. En el caso de detección empleando LSL, es necesario optimizar el “*delay time*” o *tiempo de retardo* y el “*gate time*” o *tiempo de medida*. El *tiempo de retardo* es el tiempo que tarda el equipo en comenzar a adquirir la señal de emisión tras producirse la excitación; esta variable nos proporciona la condición necesaria para que no se adquiriera señal de fluorescencia, sino sólo señal de luminiscencia retardada. Por otra parte, el *tiempo de medida* es el tiempo durante el cual el equipo adquiere la señal analítica.

4.4.3. Variables químicas

Entre las variables químicas a estudiar se incluyen: la naturaleza, concentración y pH de la disolución de muestra, la naturaleza, concentración y pH del portador y eluyente (si lo hay) y la concentración y volumen de reactivos (en los casos donde sea necesaria una reacción derivatizadora). Todas ellas, en mayor o menor medida influyen en la retención/elución de los analitos y, por lo tanto, en la señal analítica y en la separación de los diferentes componentes en el caso de mezclas de dos o más especies.

La naturaleza, concentración y pH de la muestra es una variable crítica cuando se trabaja con resinas de intercambio iónico. El pH tiene influencia especialmente en las especies que poseen comportamiento ácido-base, provocando su ionización y permitiendo así la fijación o no de éstas en la resina. Sin embargo, generalmente carece de efecto significativo cuando el analito no sufre equilibrios protolíticos. El pH y la naturaleza de la disolución portadora también deben ser

investigados ya que pueden influir en la señal en sentido similar al de la muestra. Cuando el soporte sólido utilizado sea una resina de intercambio iónico, lo más apropiado es utilizar disoluciones de portador acuosas, mientras que cuando el soporte sólido utilizado sea un gel adsorbente no polar, los portadores más adecuados son de naturaleza alcohólica.

Tras la medida, la zona sensora tiene que ser regenerada para la siguiente determinación, haciendo así que el sensor sea reutilizable. Llevar a cabo este paso de regeneración es un requisito clave e importante ya que va a determinar la rapidez, sencillez del montaje, reproducibilidad, vida media del soporte sólido, etc. Dependiendo del tipo de analito y de sus propiedades físicas y químicas (polaridad, equilibrios ácido-base, grupos funcionales característicos, mecanismo de retención del soporte sólido elegido, etc.) se optará por una determinada estrategia para llevar a cabo la elución del analito y proceder a otra nueva determinación. Las estrategias a seguir son:

- El procedimiento más simple de regeneración se da en aquellos casos en los que la propia disolución portadora actúa como eluyente. En este caso, el proceso de regeneración comienza justo en el momento en el que el extremo posterior del bolo de muestra alcanza el soporte sólido. La concentración creciente de la solución portador/eluyente suele actuar disminuyendo la respuesta analítica del sensor, en el caso de cambiadores iónicos, pues los iones del eluyente compiten con la especie de interés por su fijación en la zona sensora. Es el procedimiento más sencillo y permite frecuencias de muestreo altas y asegura una mayor duración del soporte cuando éste es una resina de intercambio iónico.
- En los casos en los que no es posible la regeneración del sensor con el propio portador se emplea una solución eluyente adicional, que se hace llegar a la zona sensora mediante la inserción de un volumen definido en el sistema. Se consigue una mayor sensibilidad al no haber elución simultánea al proceso de retención, siendo la preconcentración más efectiva. No obstante, el uso de un eluyente da lugar a una menor frecuencia de muestreo y acorta la vida del sensor si el soporte es una resina de intercambio iónico. Los agentes utilizados en la regeneración de sensores varían en función de la naturaleza de las especies retenidas y del tipo de interacción entre dichas especies y el soporte sólido. Pueden utilizarse, entre otros, agentes oxidantes o reductores, tensioactivos, agentes complejantes y disoluciones ácidas, básicas y salinas. En el caso de utilizar gel de sílice C_{18} como soporte sólido suelen emplearse soluciones metanólicas de diferente concentración. Sin embargo, no siempre es posible la elución de este analito o su producto de reacción. En estos casos se justifica el uso de la renovación de la superficie sensora mediante inyección en flujo, que evita la necesidad de un mecanismo de funcionamiento reversible del sensor. Esta metodología está basada en el concepto de

espectroscopía con inyección de partículas o microesferas (“*bead injection spectroscopy*”)^{104,105}.

4.4.4. Variables del sistema de flujo

En este caso cabe distinguir entre el caudal, tiempo de irradiación y volumen de muestra.

✓ *Caudal*

La influencia del caudal es dependiente de la rapidez del proceso de retención en la zona sensora. Cuando la cinética de retención del analito es muy rápida se originan señales apenas afectadas por el caudal, dentro de los valores permitidos para éste. En cambio, cuando la cinética de retención es lenta se obtienen señales analíticas que decrecen al aumentar el caudal, lo que conlleva una disminución en la sensibilidad, aunque por otro lado aumenta la frecuencia de muestreo. Por lo tanto, hay que adoptar una solución de compromiso entre sensibilidad y rapidez de análisis.

✓ *Tiempo de irradiación*

El tiempo de irradiación es un factor crucial en aquellos optosensores que están basados en PIF y viene determinado por la longitud del fotorreactor y el caudal. El tiempo de irradiación óptimo es aquel para el cual se obtiene la máxima señal analítica, esto es, se obtiene la máxima cantidad de fotoproducto que se monitorizará a posteriori. A valores de tiempo inferiores al tiempo de irradiación óptimo existe una cierta cantidad de analito inicial susceptible de ser fotoconvertido, aunque esto todavía no ha tenido lugar. A valores de tiempo superiores a este tiempo de irradiación óptimo, la intensidad de señal disminuye debido a que el fotoproducto generado es a su vez fotodegradado en el medio de reacción en el que se encuentra.

✓ *Volumen de muestra*

Una de las características más destacables de los sensores en flujo continuo es la posibilidad de incrementar sustancialmente la sensibilidad incrementando el volumen de muestra insertado, como consecuencia del incremento de la cantidad de analito retenido en la zona de detección. Cuando el coeficiente de distribución es alto, la dependencia de la señal con el volumen de muestra es lineal. Esto dota a estos sensores de una gran versatilidad para trabajar en un amplio rango de concentraciones, simplemente cambiando el volumen de muestra insertado. Es necesario

¹⁰⁴ M.J. Ruedas-Rama, A. Ruiz-Medina, A. Molina-Díaz, *Analytica Chimica Acta* 482 (2003) 209-217.

¹⁰⁵ M.J. Ruedas-Rama, A. Ruiz Medina, A. Molina Díaz, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 35 (2004) 1027-1034.

tener en cuenta que en los sensores basados en la metodologías FIA y SIA se habla de volumen de muestra, mientras que en los sensores basados en MCFIA hay que hablar de tiempo de inserción de muestra (conocido el tiempo de inserción y el caudal se puede calcular el volumen insertado).

5. Los analitos y su determinación

Los analitos seleccionados en la realización de esta Memoria de Tesis Doctoral, para los que se han desarrollado optosensores en flujo, son especies de interés en el campo agroalimentario, clínico y farmacológico. A continuación se realizará una breve introducción de cada uno de ellos, así como de las técnicas de análisis descritas previamente en bibliografía para su determinación.

5.1. Principios activos

5.1.1. Cromolín

El cromoglicato disódico (SCG), conocido también como cromolín (*Figura I.13*), es un potente anti-alérgico que puede ser inhalado o bien aplicado a nivel local. Está prácticamente libre de efectos secundarios y es altamente soluble en agua. Es eficaz para tratar el asma y la rinitis alérgica¹⁰⁶. Después de su administración oral solo una porción muy pequeña (aproximadamente 1-3%) es absorbida por el tracto gastrointestinal. Sin embargo después de la inhalación, el fármaco es bien absorbido por el epitelio respiratorio en el sistema circulatorio. En ambos casos la mayor parte es eliminada de manera inalterada y en proporciones aproximadamente iguales en la orina y la bilis. Por lo tanto la determinación de la droga en la excreción urinaria es un indicador de la dosis absorbida por el cuerpo.

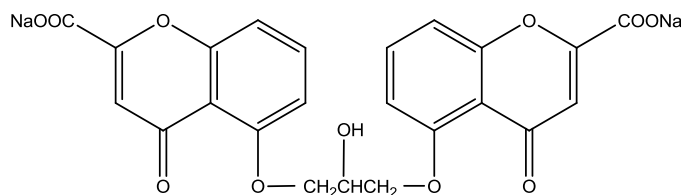


Figura I.13. Estructura del cromolín

Para su determinación se han establecido métodos tales como la cromatografía en capa fina con detección densiométrica¹⁰⁷, radioinmunoensayo¹⁰⁸ o voltamperometría de redisolución catódica¹⁰⁹, aunque los métodos más recientes desarrollados para su determinación se basan en

¹⁰⁶ Z.J. Lin, R. Abbas, L.M. Rusch, L. Shum, *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 788 (2003) 159-166.

¹⁰⁷ V. Kocic-Pesic, D. Radulovic, D. Pecanac, L. Zivanovic, *Farmaco* 47 (1992) 1563-1567.

¹⁰⁸ K. Brown, J.J. Gardner, W.J.S. Lockley, *Annals of Clinical Biochemistry* 20 (1983) 31-36.

¹⁰⁹ F.C. Pereira, A.G. Fogg, M.V.B. Zanoni, *Talanta* 60 (2003) 1023-1032.

HPLC^{106,110,111}. Sin embargo, existe una clara y completa ausencia de metodologías espectroscópicas para la determinación de SCG, no solo en fluidos biológicos, sino también en fármacos, como alternativa a los métodos cromatográficos.

5.1.2. Cefadroxilo

El cefadroxilo monohidrato (CFD) es un antibiótico semisintético de la familia de las cefalosporinas (*Figura I.14*). Presenta un eficaz efecto contra las infecciones bacterianas gram-positivas y gram-negativas. Concretamente es usado para el tratamiento de infecciones graves causadas por cepas susceptibles de microorganismos en las siguientes enfermedades: infecciones respiratorias de las vías bajas, infecciones genitourinarias (especies de *E.coli*, *P.mirabilis* y *Klebsiella*), infecciones ginecológicas, infecciones de la piel (*Estafilococos* y/o *Streptococos*), faringitis y/o amigdalitis (*Streptococos pyogenes* y *Streptococos del grupo A beta-hemolítico*) e infecciones del sistema nervioso central¹¹². Este fármaco es una buena alternativa para el tratamiento de infecciones que son resistentes a los derivados de la penicilina.

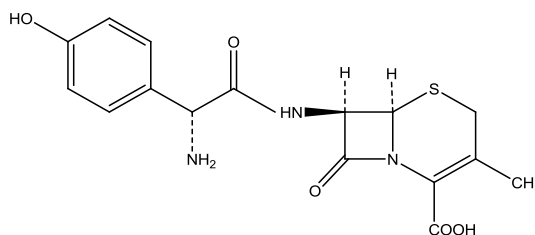


Figura I.14. Estructura del cefadroxilo

Se han descrito diferentes metodologías analíticas para la determinación de CFD en fármacos y fluidos biológicos. La mayoría de los métodos desarrollados hasta la fecha se basan en la espectrofotometría UV-visible^{113,114,115}, fluorimetría^{116,117} y CL^{118,119,120,121}, aunque se han propuesto también otros que hacen uso de HPLC^{122,123}, con detección espectrofotométrica, e

¹¹⁰ O.A. Aswania, S.A. Corlett, H. Chrystyn, *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications* 690 (1997) 373-378.

¹¹¹ M.L. Ozoux, J. Girault, J.M. Malgouyat, O. Pasquier, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 765 (2001) 179-185.

¹¹² J. Makchit, S. Upalee, C. Thongpoon, B. Liawruangrath, S. Liawruangrath, *Analytical Sciences* 22 (2006) 591-597.

¹¹³ G.A. Saleh, H.F. Askal, M.F. Radwan, M.A. Omar, *Talanta* 54 (2001) 1205-1215.

¹¹⁴ A.F.M. El Walily, A.A.K. Gazy, S.F. Belal, E.F. Khamis, *Spectroscopy Letters* 33 (2000) 931-948.

¹¹⁵ S. Hesham, *Analytica Chimica Acta* 515 (2004) 333-341.

¹¹⁶ A.F. El Walily, A. Abdel-Kader Gazy, S.F. Belal, E.F. Khamis, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 20 (1999) 643-653.

¹¹⁷ M. Hefnawy, Y. El Shabrawy, F. Belal, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 21 (1999) 703-707.

¹¹⁸ F.A. Aly, N.A. Alarfajj, A.A. Alwarthan, *Talanta* 47 (1998) 471-478.

¹¹⁹ S.A. Ozkan, N. Erk, B. Uslu, N. Yilmaz, I. Biryol, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 23 (2000) 263-273.

¹²⁰ Y. Sun, Y. Tang, H. Yao, X. Zheng, *Talanta* 64 (2004) 156-159.

¹²¹ C. Thongpoon, B. Liawruangrath, S. Liawruangrath, R.A. Wheatley, A. Townshend, *Analytica Chimica Acta* 553 (2005) 123-133.

¹²² A. El Gindy, A.F.M. El Walily, M.F. Bedair, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 23 (2000) 341-352.

¹²³ V.F. Samanidou, A.S. Ioannou, I.N. Papadoyannis, *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 809 (2004) 175-182.

incluso un método voltamperométrico¹¹⁹. La mayoría de estas metodologías hacen uso de reactivos adicionales para aumentar la sensibilidad de la determinación.

5.1.3. Indometacina

La indometacina (INM) (*Figura I.15*) es un medicamento tradicional del tipo antiinflamatorio no esteroideo perteneciente a la familia de derivados del ácido indolacético. Con propiedades analgésicas y antipiréticas se usa principalmente en el tratamiento de las enfermedades reumáticas, aunque otros usos son el alivio del dolor agudo de articulaciones y columna vertebral y el tratamiento de enfermedades degenerativas de las articulaciones y ligamentos, como la artritis reumatoide y la osteoartritis¹²⁴.

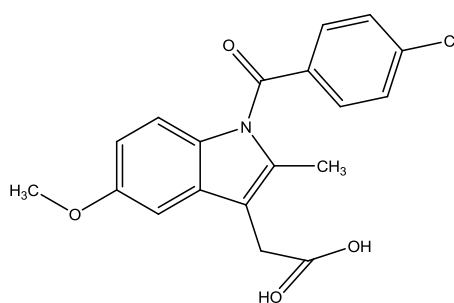


Figura I.15. Estructura de la Indometacina

Se han desarrollado numerosos métodos para la determinación de INM en diferentes matrices farmacológicas o de interés biomédica. Los métodos espectroscópicos creados para tal fin hacen uso de los siguientes tipos de detección: espectrofotometría UV-visible^{125,126}, fluorimetría^{127,128} y CL¹²⁹. Además también se ha empleado la cromatografía de gases (GC)¹³⁰, HPLC^{131,132,133,134} y electroforesis capilar de zona (ZCE)^{135,136}. Por último, se han propuesto técnicas

¹²⁴ Czech drug database, AISLP-Automated information system of pharmaceuticals preparations (2009), <http://www.aislp.cz/en>.

¹²⁵ M. Stolarczyk, J. Krzek, W. Rzeszutko, *Journal of AOAC International* 87 (2004) 592-595.

¹²⁶ T. Aman, F. Naureen, A.A. Kazi, I.U. Khan, M.A. Kashmiri, *Analytical Letters* 35 (2002) 1007-1020.

¹²⁷ P.C.A.G. Pinto, M.L.M.F. Saraiva, J.L.M. Santos, J.L.F.C. Lima, *Analytica Chimica Acta* 539 (2005) 173-179.

¹²⁸ C.S.P. Sastry, D.S. Mangala, K. Ekambareswara Rao, *Analyst* 111 (1986) 323-325.

¹²⁹ K. Mervartová, M. Polásek, J.M. Calatayud, *Analytica Chimica Acta* 600 (2007) 114-121.

¹³⁰ R. Nishioka, T. Harimoto, I. Umeda, S. Yamamoto, N. Oi, *Journal of Chromatography - Biomedical Applications* 526 (1990) 210-214.

¹³¹ M.A. Al Za'abi, G.H. Dehghanzadeh, R.L.G. Norris, B.G. Charles, *Journal of Chromatography B* 830 (2006) 364-367.

¹³² E. Grippa, L. Santini, G. Castellano, M.T. Gatto, M.G. Leone, L. Saso, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 738 (2000) 17-25.

¹³³ D. Löffler, T.A. Ternes, *Journal of Chromatography A* 1021 (2003) 133-144.

¹³⁴ W.F. Bayne, T. East, D. Dye, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 70 (1981) 458-459.

¹³⁵ Y.L. Chen, S.M. Wu, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 381 (2005) 907-912.

¹³⁶ K. Makino, T. Yano, T. Maiguma, D. Teshima, T. Sendo, Y. Itoh, R. Oishi, *Therapeutic Drug Monitoring* 25 (2003) 574-580.

electroanalíticas como la voltamperometría de redisolución adsortiva^{137,138} y la potenciometría¹³⁹ para su determinación.

5.2. Compuestos de interés en alimentos y bebidas

5.2.1. Constituyentes naturales

5.2.1.1. Resveratrol

Numerosos estudios resaltan los beneficios que aporta una dieta rica en frutas y vegetales, siendo este efecto atribuido a su contenido en polifenoles, que constituyen una familia de compuestos cuyas propiedades antioxidantes están ampliamente documentadas^{140,141}. En la última década muchos han sido los investigadores que han volcado su atención, más concretamente, en el resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno) (RVT) (*Figura 1.16*), un compuesto perteneciente a este grupo y que posee una amplia e interesante actividad biológica: propiedades antioxidantes, anticarcinogénicas, antimutagénicas, antihistamínicas, cardioprotectoras, neuroprotectoras y antiinflamatorias^{142,143,144,145,146}. Sus propiedades beneficiosas están asociadas incluso con la reducción de la diabetes y la enfermedad del Alzheimer^{142,147,148,149,150}.

El RVT es un compuesto polifenólico perteneciente a la familia de los estilbenoides que puede actuar como una fitoalexina. Las fitoalexinas son compuestos antimicrobianos que se acumulan de manera natural en algunas plantas en altas concentraciones, como respuesta a

¹³⁷ C. Reguera, M. Julia Arcos, M. Cruz Ortíz, *Talanta* 46 (1998) 1493-1505.

¹³⁸ G.B. El Hefnawy, I.S. El Hallag, E.M. Ghoneim, M.M. Ghoneim, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 376 (2003) 220-225.

¹³⁹ R. Aubeck, C. Brauchle, N. Hampp, *Analyst* 116 (1991) 811-814.

¹⁴⁰ L.J. Marnett, *Carcinogenesis* 21 (2000) 361-370.

¹⁴¹ E. Menat, *Phytotherapie* 4 (2006) HS40-HS45.

¹⁴² A.A.E. Bertelli, L. Giovannini, D. Giannesi, M. Migliori, W. Bernini, M. Fregoni, A. Bertelli, *International Journal of Tissue Reactions* 17 (1995) 1-3.

¹⁴³ E.N. Frankel, A.L. Waterhouse, J.E. Kinsella, *Lancet* 341 (1993) 1103-1104.

¹⁴⁴ H. Nakagawa, Y. Kiyozuka, Y. Uemura, H. Senzaki, N. Shikata, K. Hioki, A. Tsubura, *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, Supplement* 127 (2001) 258-264.

¹⁴⁵ L. Frémont, *Life Sciences* 66 (2000) 663-673.

¹⁴⁶ M.E. Ferrero, M. Corsi, L. Giovannini, C. Bonfrate, R. De Caterina, J.P. Tillement, A.A.E. Bertelli, A. Bertelli, *International Journal of Tissue Reactions* 19 (1997) 121-124.

¹⁴⁷ H.J. Um, J.H. Bae, J.W. Park, H. Suh, N.Y. Jeong, Y.H. Yoo, T.K. Kwon, *International Journal of Oncology* 36 (2010) 1007-1013.

¹⁴⁸ S.S. Karuppagounder, J.T. Pinto, H. Xu, H.L. Chen, M.F. Beal, G.E. Gibson, *Neurochemistry International* 54 (2009) 111-118.

¹⁴⁹ O. Ates, S.R. Cayli, N. Yucel, E. Altinoz, A. Kocak, M.A. Durak, Y. Turkoz, S. Yologlu, *Journal of Clinical Neuroscience* 14 (2007) 256-260.

¹⁵⁰ E.O. Lee, H.J. Park, J.L. Kang, H.S. Kim, Y.H. Chong, *Journal of Neurochemistry* 112 (2010) 1477-1488.

infecciones bacterianas o fúngicas y que ayudan a limitar la dispersión del patógeno¹⁵¹. Concretamente esta fitoalexina puede aparecer en dos formas isómeras, *cis* y *trans*¹⁵². Aunque ambas aparecen de manera natural, la mayoría de los beneficios saludables antes mencionados son atribuidos a la forma *trans*. Entre las distintas fuentes en las que el RVT está presente podemos destacar las uvas¹⁵³, y por consiguiente el vino^{154,155}, y frutos secos como los cacahuetes¹⁵⁶ y los pistachos¹⁵⁷. Otra interesante fuente de RVT es el lúpulo, utilizado por los cerveceros para proporcionar a la cerveza su sabor amargo característico así como una protección microbiana¹⁵⁸.

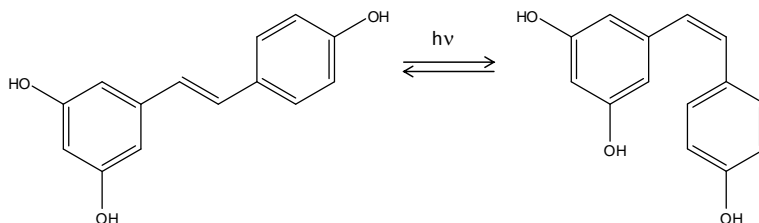


Figura I.16. Estructura del *trans*-resveratrol y *cis*-resveratrol

Dado el gran impacto generado por este compuesto en los últimos años, el desarrollo de nuevas metodologías para su determinación está siendo objetivo de muchas investigaciones. Para la determinación de RVT en muestras líquidas como el vino o el plasma se han empleado diferentes técnicas como la ZCE^{159,160}, GC¹⁶¹, GC-MS¹⁶² y HPLC-MS¹⁶³ o HPLC con otras técnicas de detección tales como diodo-array¹⁶⁴, electroquímica¹⁶⁵, CL¹⁶⁶ y fluorescencia^{167,168,169}. En cuanto a

¹⁵¹ R. Pezet, V. Pont, P. Cuenat, *Journal of Chromatography A* 663 (1994) 191-197.

¹⁵² D.M. Goldberg, E. Ng, A. Karumanchiri, J. Yan, E.P. Diamandis, G.J. Soleas, *Journal of Chromatography A* 708 (1995) 89-98.

¹⁵³ P. Langcake, R.J. Pryce, *Phytochemistry* 16 (1977) 1193-1196.

¹⁵⁴ R.M. Lamuela-Raventós, A.L. Waterhouse, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41 (1993) 521-523.

¹⁵⁵ B. Halliwell, G.P. Walsh, *The Lancet* 341 (1993) 1538.

¹⁵⁶ V.S. Sobolev, R.J. Cole, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47 (1999) 1435-1439.

¹⁵⁷ Ö. Tokusoglu, M.K. Ünal, F. Yemis, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (2005) 5003-5009.

¹⁵⁸ D. Callemien, V. Jerkovic, R. Rozenberg, S. Collin, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (2005) 424-429.

¹⁵⁹ M. Spanilá, J. Pazourek, M. Farková, J. Havel, *Journal of Chromatography A* 1084 (2005) 180-185.

¹⁶⁰ X. Gu, Q. Chu, M. O'Dwyer, M. Zeece, *Journal of Chromatography A* 881 (2000) 471-481.

¹⁶¹ A. Antonelli, C. Fabbri, G. Lercker, *Chromatographia* 42 (1996) 469-472.

¹⁶² P. Viñas, N. Campillo, N. Martínez-Castillo, M. Hernández-Córdoba, *Journal of Chromatography A* 1216 (2009) 1279-1284.

¹⁶³ L. Vlase, B. Kiss, S.E. Leucuta, S. Gocan, *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies* 32 (2009) 2105-2121.

¹⁶⁴ M.E. Juan, R.M. Lamuela-Raventós, M.C. Torre-Boronat, J.M. Planas, *Analytical Chemistry* 71 (1999) 747-750.

¹⁶⁵ K.D. McMurtrey, J. Minn, K. Pobanz, T.P. Schultz, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42 (1994) 2077-2080.

¹⁶⁶ J. Zhou, H. Cui, G. Wan, H. Xu, Y. Pang, C. Duan, *Food Chemistry* 88 (2004) 613-620.

¹⁶⁷ O. Gürbüz, D. Göçmen, F. Dagdelen, M. Gürsoy, S. Aydin, Í. Şahin, L. Büyükuysal, M. Usta, *Food Chemistry* 100 (2007) 518-525.

¹⁶⁸ I. Durán-Merás, T. Galeano-Díaz, D. Airado-Rodríguez, *Food Chemistry* 109 (2008) 825-833.

¹⁶⁹ Z. Piñeiro, M. Palma, C.G. Barroso, *Journal of Chromatography A* 1110 (2006) 61-65.

métodos espectroscópicos, solo se ha desarrollado hasta la fecha un método que hace uso del PIF (2ª derivada) para análisis de RVT en vinos¹⁷⁰.

Para la determinación de RVT en cerveza, hasta la fecha solamente se han desarrollado dos métodos cromatográficos, sin embargo las concentraciones encontradas en muestras reales se encuentran por debajo de los límites de cuantificación de los métodos propuestos¹⁷¹. Por lo tanto, su determinación plantea como reto el desarrollo de nuevos métodos analíticos más sensibles.

5.2.1.2. Piceido

El Piceido (3,5,4'-trihidroxiestilbeno-3-β-D-glucoside) (PCD) es la forma glucosilada del RVT y posee propiedades biomedicinales similares a las mencionadas anteriormente para el mismo^{172,173}. Este polifenol aparece de manera natural en una serie de familias de plantas y puede hacerlo también en sus dos formas isómeras *cis* y *trans* (Figura I.17), siendo la forma *trans* la que predomina. Se ha demostrado que los isómeros del PCD también presentan actividad inhibiendo la síntesis de eicosanoides¹⁷⁴ y reduciendo los altos niveles de lípidos¹⁷⁵. El *trans*-PCD inhibe también la oxidación de la lipoproteína de baja densidad (LDL)¹⁷⁶ y la agregación plaquetaria¹⁷⁷, y actúa además como inhibidor tumoral y de metástasis¹⁷⁸.

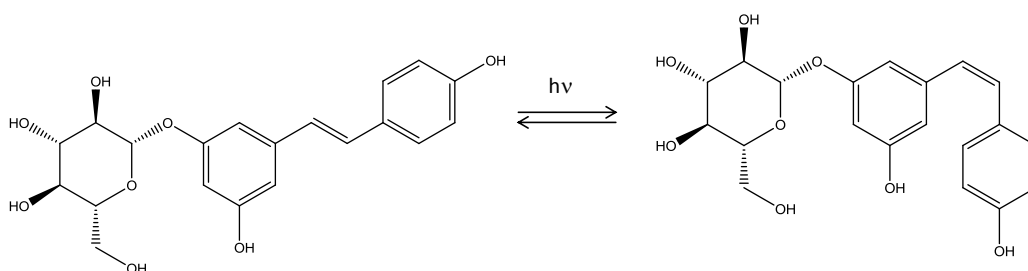


Figura I.17. Estructura del *trans*-piceido y *cis*-piceido

¹⁷⁰ T. Galeano-Díaz, I. Durán-Merás, D. Airado-Rodríguez, Analytical and Bioanalytical Chemistry 387 (2007) 1999-2007.

¹⁷¹ V. Jerkovic, F. Nguyen, A. Timmermans, S. Collin, Journal of the Institute of Brewing 114 (2008) 143-149.

¹⁷² Y. Kimura, H. Okuda, Journal of Pharmacy and Pharmacology 52 (2000) 1287-1295.

¹⁷³ C.W. Shan, S.Q. Yang, H.D. He, S.L. Shao, P.W. Zhang, Acta Pharmacologica Sinica 11 (1990) 527-530.

¹⁷⁴ Y. Kimura, H. Okuda, S. Arachi, Biochimica et Biophysica Acta 834 (1985) 275-278.

¹⁷⁵ H. Arichi, Y. Kimura, H. Okuda, K. Baba, M. Kozawa, S. Arichi, Chemical & Pharmaceutical Bulletin 30 (1982) 1766-1770.

¹⁷⁶ J.M. Merillón, B. Fauconneau, P. Waffo, L. Barrier, A. Decendit, F. Huguet, 18th International Conference on Polyphenols; Polyphenols Communications 96, Bordeaux (France), July (1996) 15-18,.

¹⁷⁷ F. Orsini, F. Pelizzoni, L. Verotta, T. Aburjai, C.B. Rogers, Journal of Natural Products 60 (1997) 1082-1087.

¹⁷⁸ Y. Kimura, H. Okuda, Journal of Pharmacy and Pharmacology 52 (2000) 1287-1295.

El PCD ha sido determinado en vinos¹⁷⁹, arándanos¹⁸⁰, cacahuets¹⁸¹, lúpulo¹⁵⁸ y en una hierba tradicional medicinal llamada *Polygonum cuspidatum*¹⁸². Como ya se ha mencionado anteriormente, el RVT y su glucósido PCD están presentes en la dieta, siendo las uvas y sus derivados una de sus fuentes principales¹⁸³. Concretamente se encuentran en la semilla y la piel de la uva, de ahí que estén presentes en el mosto y en el vino. Sus concentraciones varían desde pocos $\mu\text{g L}^{-1}$ a varios mg L^{-1} . La uva de manera natural genera los isómeros “*trans*” de RVT y PCD, sin embargo durante el proceso de producción del vino éstos se isomerizan parcialmente a la forma “*cis*”. Por lo tanto, en el vino podemos encontrar los dos isómeros de ambos compuestos. Las concentraciones de *trans*-RVT y *trans*-PCD en vino blanco son menores que las que aparecen en el vino tinto, ya que normalmente durante el proceso de producción del vino tinto la piel de las uvas es macerada junto con el mosto. La fluorescencia ha sido propuesta para la determinación de PCD en vinos, existiendo hasta la fecha tres métodos basados en PIF y fluorescencia sincrónica a temperatura ambiente^{170,184,185}. Además, recientemente, se ha detectado la presencia de *trans*-PCD en chocolate y extractos de cacao^{186,187}, el cuál proviene de las semillas de *Theobroma cacao* L. (Sterculiaceae), una especie bien conocida por su alto contenido en polifenoles¹⁸⁸. Hasta la fecha, para el análisis de *trans*-PCD en productos que contienen cacao, solamente se ha propuesto un método HPLC-MS¹⁸⁶ y otro método HPLC con detección con diodo-array¹⁸⁷.

Por otro lado, solamente existen en la literatura métodos cromatográficos para la determinación simultánea de ambos estilbenos. Éstos se basan usualmente en la medida del isómero *trans* de ambos compuestos, aunque hay algunos métodos en los que también se determina el isómero *cis*. Existe un problema en este último caso y es que el isómero *cis* no está comercialmente disponible. Esto conlleva el tener que obtenerlo a partir del isómero *trans* bien por

¹⁷⁹ R.M. Lamuela-Raventós, A.I. Romero-Pérez, A.L. Waterhouse, M.C. Torre-Boronat, Journal of Agricultural and Food Chemistry 43 (1995) 281-283.

¹⁸⁰ Y. Wang, F. Catana, Y. Yang, R. Roderick, R.B. Van Breenen, Journal of Agricultural and Food Chemistry 50 (2002) 431-435.

¹⁸¹ M. Ibern-Gómez, S. Roig-Pérez, R.M. Lamuela-Raventós, M.C. Torre-Boronat, Journal of Agricultural and Food Chemistry 48 (2000) 6352-6354.

¹⁸² L. Chena, Y. Hana, F. Yang, T. Zhang, Journal of Chromatography A 907 (2001) 343-346.

¹⁸³ M.T. Ribeiro De Lima, P. Waffo-Téguo, P.L. Teissedre, A. Pujolas, J. Vercauteren, J.C. Cabanis, J.M. Mérillon, Journal of Agricultural and Food Chemistry 47 (1999) 2666-2670.

¹⁸⁴ I. Durán- Merás, T. Galeano-Díaz, D. Airado-Rodríguez, Talanta 74 (2008) 675-682.

¹⁸⁵ P. Godoy-Caballero, D. Airado-Rodríguez, I. Durán-Merás, T. Galeano-Díaz, Talanta 82 (2010) 1733-1741.

¹⁸⁶ C. Counet, D. Callemien, S. Collin, Food Chemistry 98 (2006) 649-657.

¹⁸⁷ W.J. Hurst, J.A. Glinski, K.B. Miller, J. Apgar, M.H. Davey, D.A. Stuart, Journal of Agricultural and Food Chemistry 56 (2008) 8374-8378.

¹⁸⁸ M. Natsume, N. Osakabe, M. Yamagishi, T. Takizawa, T. Nakamura, H. Miyatake, T. Hatano, T. Yoshida, Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 64 (2000) 2581-2587.

exposición a la luz del sol o a radiación ultravioleta¹⁸⁹, lo que implica un estricto control de las condiciones experimentales¹⁹⁰.

5.2.2. Contaminantes

5.2.2.1. Aflatoxina B₁

Las aflatoxinas son micotoxinas producidas por especies del género de hongos *Aspergillus*, los más notables *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* y *Aspergillus parasiticus*¹⁹¹. Pero también pueden ser producidas por hongos del género *Penicillium*, como *P. verrucosum*. Son los principales metabolitos secundarios de dichas especies y son muy tóxicas. Este tipo de hongo aparece en los alimentos cuando las condiciones de humedad y temperatura son favorables. Poseen efectos perjudiciales para la salud como son la actividad mutagénica, carcinogénica, teratogénica y el efecto hepatotóxico¹⁹². La aflatoxina más tóxica es la aflatoxina B₁ (AFB₁) (*Figura 1.18*), clasificada por la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC) como Grupo I de carcinógeno humano¹⁹³, estando la Dosis Letal Media (LD₅₀) comprendida entre valores de 0.3 a 0.9 mg kg⁻¹ de peso corporal. El contenido en alimentos de esta micotoxina está regulado por la Legislación Europea¹⁹⁴, siendo el máximo permitido para el consumo directo humano 2 ng g⁻¹. La aparición de aflatoxinas en alimentos puede producirse tanto por una contaminación directa a través de los productos de granos y cereales (antes de la cosecha o durante el almacenaje) o por el “arrastre” de estos compuestos y sus metabolitos en los tejidos animales, leche y carne después de la ingesta de alimentos contaminados. La AFB₁ aparece normalmente en el grano (maíz, trigo, avena), así como en el cacahuete, la semilla de algodón, la nuez, la almendra, el higo, frutas y especias¹⁹⁵.

¹⁸⁹ A.I Romero-Pérez, R.M Lamuela-Raventós, A.L Waterhouse, M.C De La Torre-Boronat, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44 (1996) 2124-2128.

¹⁹⁰ G. Montsko, M.S.P. Nikfardjam, Z. Szabo, K. Boddi, T. Lorand, R. Ohmacht, L. Mark, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 196 (2008) 44-50.

¹⁹¹ R. Asis, R.D. Di Paola, M.A.J. Aldao, *Food and Agricultural Immunology* 14 (2002) 201-208.

¹⁹² R. Krska, P. Schubert-Ullrich, A. Molinelli, M. Sulyok, S. MacDonald, C. Crews, *Food Additives and Contaminants* 25 (2008) 152-163.

¹⁹³ International Agency for Research on Cancer (IARC). *Monographs 6 on the evaluation of carcinogenic risks to humans*. Lyon: IARC, (1993) 245-395.

¹⁹⁴ EC 2006. European Commission Regulation No. 1881/2006 of 19 December 2006. *Off J Eur Union* L 364/52012.

¹⁹⁵ H. Gourama, L.B. Bullerman, *Journal of Food Protection* 58 (1995) 1395-1404.

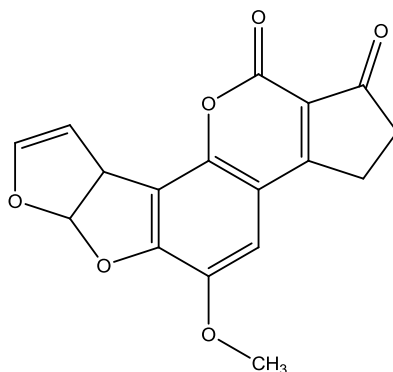


Figura I.18. Estructura de la Aflatoxina B1

Para la determinación de la AFB₁ se precisa de métodos fiables y sensibles, dada la complejidad de las matrices en las que aparece y su baja concentración. Con este objetivo se han desarrollado métodos tales como electroforesis capilar (CE)¹⁹⁶, TLC¹⁹⁷, HPLC¹⁹⁸ y ensayo de inmunoabsorción con enzimas ligadas (ELISA)¹⁹⁹.

Aunque la AFB₁ presenta fluorescencia nativa, su determinación por fluorimetría es difícil debido a la complejidad de las matrices en las que se encuentra y a la existencia en las mismas de una gran variedad de componentes naturales fluorescentes. Es por ello que se han utilizado diferentes estrategias para evitar este inconveniente e incrementar la fluorescencia exhibida, tales como el uso de β -ciclodextrinas o la modificación de su molécula con cloro o bromo^{200,201}. Hasta la fecha, no se ha descrito ningún sensor óptico para el análisis de esta micotoxina.

5.2.2.2. Bisfenol A

El Bisfenol A (2,2-bis(4-hidroxifenil)propano), conocido como BPA (*Figura I.19*), es un polifenol que se utiliza ampliamente en la industria como producto intermedio en la producción de plásticos de policarbonato (PC) y resinas epoxi, y también es usado como antioxidante en los plásticos de PVC^{202,203}. Las resinas epoxi se usan como revestimiento de la superficie interior de los contenedores de alimentos y bebidas, y de las latas, con el fin de proteger los alimentos del contacto directo con los metales. Por otro lado, los PC se utilizan en los envases para alimentos, tales como botellas de agua y biberones. Por lo tanto el BPA, inevitablemente, puede migrar de

¹⁹⁶ R. Peña, M.C. Alcaraz, L. Arce, A. Ríos, M. Valcárcel, *Journal of Chromatography A* 967 (2002) 303-314.

¹⁹⁷ J. Stroka, R.V. Otterdijk, E. Anklam, *Journal of Chromatography A* 904 (2000) 251-256.

¹⁹⁸ A.H.W. Abdulkadar, A.A. Al Ali, A.M. Al Kildi, J.H. Al Jedah, *Food Control* 15 (2004) 543-548.

¹⁹⁹ S.R. Garden, N.J.C. Strachan, *Analytica Chimica Acta* 444 (2001) 187-191.

²⁰⁰ M. Mably, M. Mankotia, P. Cavlovic, J. Tam, L. Wong, P. Pantazopoulos, P. Calway, P.M. Scott, *Food Additives and Contaminants* 22 (2005) 1252-1257.

²⁰¹ J. Hashemi, G.A. Kram, N. Alizadeh, *Talanta* 75 (2008) 1075-1081.

²⁰² European Directive 2002/72/EC, Amendment 2004/19/EC.

²⁰³ Scientific Committee on Food, Opinion of the Scientific Committee on Food on Bisphenol A, SCF/CS/PM/3936, Brussel, 2002.

estos envases y latas hasta los alimentos y bebidas que contienen en su interior. De hecho, se han detectado residuos de BPA en vino, agua mineral, leche y diferentes comestibles. La exposición a dosis mucho menores que el límite de $5 \mu\text{g Kg}^{-1}$ de peso corporal al día puede suponer ciertos riesgos para la salud²⁰⁴. El BPA interfiere potencialmente con el sistema endocrino tanto de la vida silvestre como de la humana, aumenta la tasa de cáncer, reduce la función inmunológica y pone en peligro la reproducción²⁰⁵. Su acción estrogénica ha sido demostrada en experimentos tanto in vitro como in vivo²⁰⁶.

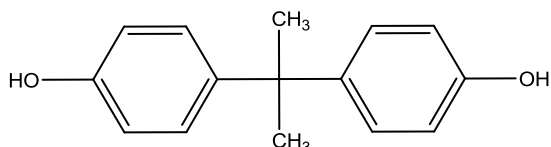


Figura I.19. Estructura del Bisfenol A

Dado que el BPA aparece normalmente a nivel de trazas es común realizar una etapa previa de preconcentración y/o limpieza (antes de llevar a cabo su análisis). Se han propuesto varias técnicas para ello tales como cromatografía capilar electrocinética micelar (MECC), extracción en fase sólida con polímeros generados por impresión molecular (MISPE), dispersión de matriz en fase sólida (MSPD)^{207,208,209} y SPE²¹⁰.

Las técnicas GC^{211,212} y HPLC^{213,214}, ambas acopladas con MS, han sido hasta la fecha las más utilizadas para la determinación del BPA. También se han propuesto métodos luminiscentes^{215, 216} o electroanalíticos²¹⁷. En el caso concreto de la determinación de BPA en leche, hasta la fecha

²⁰⁴ F.S. Vom Saal, W.V. Welshons, *Environmental Research* 100 (2006) 50-76.

²⁰⁵ S.H. Safe, *Environmental Health Perspectives* 108 (2000) 487-493.

²⁰⁶ N. Suzuki, A. Hattori, *Life Sciences* 73 (2003) 2237-2247.

²⁰⁷ H. Gallart-Ayala, O. Núñez, E. Moyano, M.T. Galceran, *Electrophoresis* 31 (2010) 1550-1559.

²⁰⁸ S. Mei, D. Wu, M. Jiang, B. Lu, J.M. Lim, Y.K. Zhou, Y.I. Lee, *Microchemical Journal* 98 (2011) 150-155.

²⁰⁹ B. Shao, H. Han, X. Tu, L. Huang, *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 850 (2007) 412-416.

²¹⁰ T. Wu, W.Y. Wang, L.M. Jiang, Q.C. Chu, J. Delaire, J.N. Ye, *Chromatographia* 68 (2008) 339-344.

²¹¹ S. Morales-Muñoz, J.L. Luque-García, M.J. Ramos, A. Fernández-Alba, M.D. Luque de Castro, *Analytica Chimica Acta* 552 (2005) 50-59.

²¹² T. Geens, H. Neels, A. Covaci, *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 877 (2009) 4042-4046.

²¹³ J.D. Stuart, C.P. Capulong, K.D. Launer, X. Pan, *Journal of Chromatography A* 1079 (2005) 136-145.

²¹⁴ N.C. Maragou, E.N. Lampi, N.S. Thomaidis, M.A. Koupparis, *Journal of Chromatography A* 1129 (2006) 165-173.

²¹⁵ C. Lu, J. Li, Y. Yang, J.M. Lin, *Talanta* 82 (2010) 1576-1580.

²¹⁶ X. Wang, H. Zeng, L. Zhao, J.M. Lin, *Analytica Chimica Acta* 556 (2006) 313-318.

²¹⁷ F. Wang, J. Yang, K. Wu, *Analytica Chimica Acta* 638 (2009) 23-28.

sólo se han propuesto métodos cromatográficos, no habiendo sido explotada la medida de su fluorescencia nativa.

CAPÍTULO II

Discusión conjunta de resultados

Discusión conjunta de resultados

En este capítulo se va a describir de forma conjunta y resumida la puesta a punto y aplicaciones de los optosensores desarrollados en esta Memoria. El trabajo experimental a seguir en todos los casos tiene una base común en el orden de ejecución de los estudios necesarios, en cuanto a las variables y otros parámetros a optimizar en los sistemas propuestos. Se seguirá una discusión que describa los reactivos e instrumentación empleados, la optimización de las variables de la unidad de retención/detección, la configuración de los sistemas de flujo y los procedimientos, la optimización de las variables químicas y variables del sistema de flujo, los parámetros analíticos más relevantes, el estudio de posibles especies interferentes y las aplicaciones analíticas.

Para la descripción completa de la optimización de las variables de la unidad de retención/detección, configuración del sistema y variables químicas y del sistema de flujo que afectan a los sistemas propuestos, se han seleccionado cuatro de los ocho optosensores desarrollados (SCG, CFD, RVT/PCD y BPA), que abarcan tanto las distintas metodologías de flujo como las diferentes técnicas de detección empleadas en esta Memoria, de forma que su descripción permita una visión completa del trabajo desarrollado. Las variables optimizadas para los otros cuatro optosensores (RVT, PCD, INM y AFB₁) se presentan de forma resumida en tablas que recogen los resultados obtenidos para todos los optosensores.

1. Reactivos e Instrumentación

1.1. Reactivos

Para todos los experimentos realizados se usaron reactivos de calidad “para análisis”, disolventes puros y agua desionizada. Las disoluciones estándar de los analitos fueron preparadas disolviendo una cantidad apropiada en metanol, etanol o agua desionizada según las características concretas de cada analito. De igual forma, siempre se emplearon precisiones de 0.1 mg en la pesada y material de vidrio volumétrico para la preparación de todas las disoluciones, siendo éstas almacenadas finalmente a 4° C. En los casos en los que fue necesario, las disoluciones se protegieron de la luz con papel de aluminio.

En aquellos sistemas desarrollados mediante el uso de PIF, las disoluciones estándar de los analitos, una vez preparadas, se protegieron de la luz con papel de aluminio para evitar cualquier tipo de fotodegradación debido a la luz natural.

1.2. Instrumentación

La instrumentación y aparatos utilizados en los sistemas propuestos son los que habitualmente se requieren para el desarrollo de métodos de análisis basados en sistemas de flujo continuo SIA y MCFIA y que ya han sido mencionados en capítulos anteriores. Se describen a continuación.

1.2.1. Sistema de propulsión

- MCFIA

En todos los métodos desarrollados con sistemas de válvulas solenoides se empleó una bomba peristáltica de cuatro canales “Gilson Minipuls 3” (Villiers Le Bel (Francia)), que consta de un tambor y una serie de rodillos que comprimen unos tubos flexibles a través de los cuales circula el flujo del sistema (*Figura II.1.*). Esta bomba tiene control de velocidad para seleccionar el flujo de los canales y proporciona un flujo libre de pulsos.



Figura II.1. Bomba peristáltica Gilson Minipuls-3

- SIA

Para los métodos SIA desarrollados se usó una bomba Cavro XP 3000 (Cavro Scientific Instrument, Sunnyvale, California, USA) compuesta por un pistón y una jeringa con una capacidad de 5 mL. Por medio del pistón se aspiraban o impulsaban las disoluciones requeridas, mientras que los procesos se controlaban por ordenador mediante el software Sagittarius version 3.0.25 (bajo sistema Windows), desarrollado en la Universidad Técnica de Viena.

1.2.2. Sistema de inserción de muestra y selección/manipulación de reactivos

- MCFIA

En el caso de los sistemas basados en multiconmutación, la inserción de muestra y manipulación de reactivos se llevó a cabo mediante el empleo de válvulas solenoide de tres vías NResearch 161T031 Standard 3w (Neptuno Research, MA, USA) que estaban conectadas de forma apropiada para llevar a cabo las distintas etapas establecidas en el método (inserción de muestra, elución de la especie de interés, re-acondicionamiento de la zona sensora, etc).

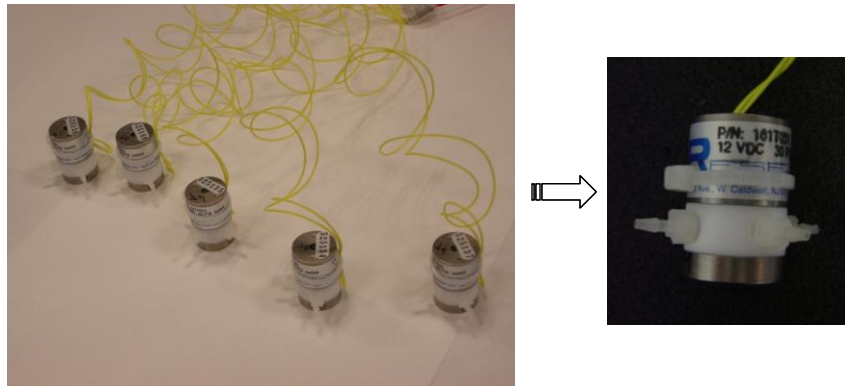


Figura II.2. Válvulas solenoides de tres vías

Estas válvulas de tres vías (*Figura II.2*) tienen dos posiciones: “ON” y “OFF”. Según las disoluciones se aspiren o impulsen, las válvulas presentarán dos entradas y una salida o una entrada y dos salidas, respectivamente. El esquema del funcionamiento de las válvulas usado en el desarrollo de todos los sistemas aquí descritos puede observarse en la *Figura I.8*. Las válvulas se controlan mediante un software a través de una interfase RS232 vía puerto paralelo. Dicha interfase permite el control de hasta 8 válvulas, merced a un circuito integrado ULM 2803. La corriente de alimentación de cada válvula (100 mA) es proporcionada por una pequeña fuente de alimentación de corriente continua de 12 V y 1 A. El ciclo de apertura y cierre de las válvulas solenoide que se emplean en cada sistema es programado a través de un software (*Figura II.3*) elaborado por nuestro grupo de investigación.

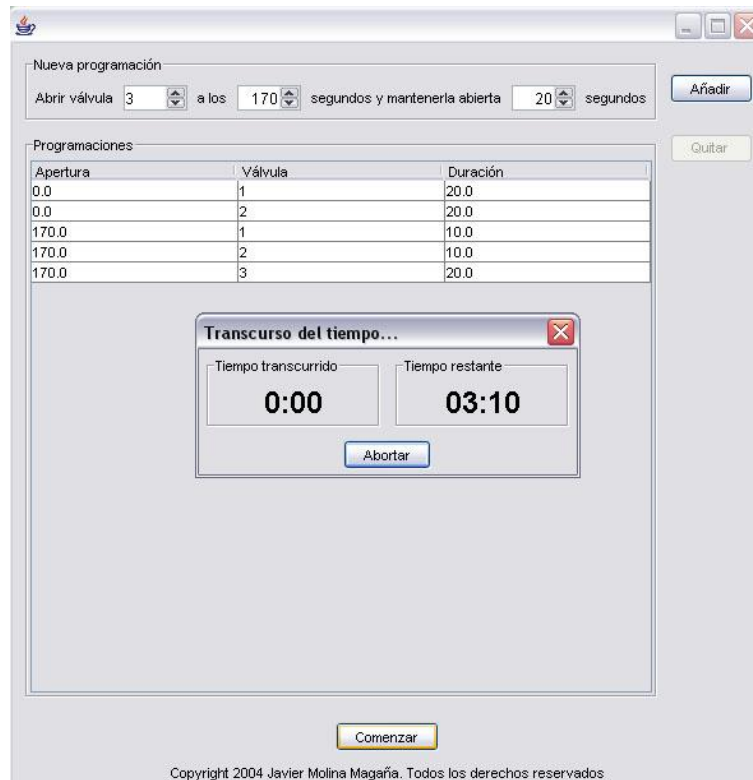


Figura II.3. Interfaz de usuario del software empleado para la programación de válvulas solenoide

▪ SIA

En el caso de los sistemas SIA desarrollados, se usó una válvula multiposición de 10 vías (Valco Instruments Co. Inc., Houston, Texas, USA). En la *Figura II.4* puede observarse una fotografía de dicha válvula junto con la bomba de pistón Cavro XP 3000.

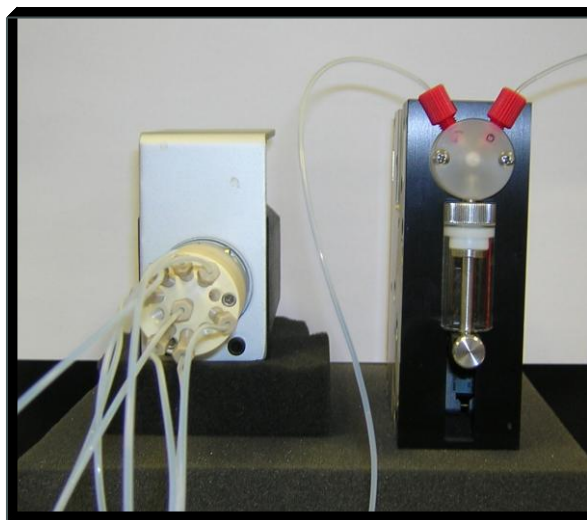


Figura II.4. Sistema SIA: válvula multiposición y bomba de pistón

1.2.3. Sistema de transporte

En todas las configuraciones se usaron tubos de teflón de 0.8 mm de diámetro interno como sistema de transporte. Las uniones se realizaron con conectores tipo Omnifit. Los tubos de bomba de silicona utilizados son de dos tipos, dependiendo del tipo de disolución portadora empleada. En los casos en los que los portadores eran disoluciones acuosas, se utilizaron tubos Kendall de diámetro interno 0.051 pulgadas. Sin embargo, cuando se emplearon disolventes orgánicos como portador se utilizaron tubos de teflón Elkay con el mismo diámetro interno. Como puntos de confluencia entre las distintas disoluciones se usaron conexiones de metacrilato elaboradas manualmente.

1.2.4. Sistema de reacción

Al igual que en el sistema de transporte, los reactores utilizados cuando han sido necesarios eran tubos de teflón de 0.8 mm de diámetro, encontrándose en este caso enrollados en forma helicoidal.

En los optosensores basados en PIF se necesita un fotorreactor para la generación de los fotoproductos a partir de los analitos. Este fue construido en nuestro laboratorio y consistía en una caja fabricada de aluminio que albergaba en su interior una lámpara germicida de mercurio a baja presión (15 W). Enrollado alrededor de dicha lámpara en forma helicoidal, se encontraba el reactor, consistente en un tubo de teflón cuya longitud era diferente en cada caso (*Figura II.5*). Este se cubría con papel de aluminio y la caja se cerraba completamente. De esta forma se conseguía una reflexión máxima de la luz y la disipación del calor, evitando así el uso de sistemas de enfriamiento.



Fig. II.5. Fotorreactor preparado para su implementación en sistemas en flujo

1.2.5. Sistema para separación de analitos: minicolumna

En el sensor biparámetro desarrollado para la determinación de RVT y PCD se usó una minicolumna, empaquetada con un soporte sólido, para la separación on-line de los fotoproductos generados a partir de los analitos. La columna era de vidrio, con 6 mm de diámetro interno y 6 cm de longitud (*Figura II.6*). Para evitar el desplazamiento del soporte sólido se colocó lana de vidrio en uno de sus extremos.

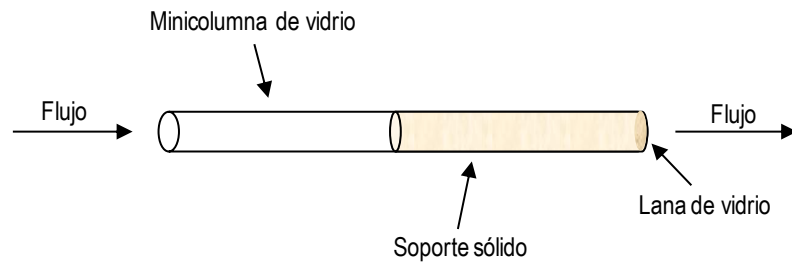


Figura II.6. Esquema de una minicolumna de vidrio para la separación on-line de mezclas de analitos

1.2.6. Sistema de detección

Aunque en todos los sensores desarrollados en esta Memoria se ha utilizado detección luminiscente hay que distinguir, en función del tipo, entre instrumentos diferentes:

✓ Para detección LSL y detección fluorescente (fluorescencia nativa y PIF), se empleó un espectrofluorímetro “Varian Cary Eclipse” (Mulgrave, Australia) con lámpara de descarga de Xenón de 75 kW, monocromadores Czerny-Turner y tubo fotomultiplicador R-928 (*Figura II.7*). El equipo está controlado mediante software “Cary Eclipse” para sistemas Windows 95/98/NT. El espectrofluorímetro se caracteriza por poseer una velocidad de barrido espectral muy elevada (hasta 24000 nm min⁻¹), lo que permite llevar a cabo medidas de fluorescencia con gran rapidez e incluso monitorizar hasta 5 pares de longitudes de onda de excitación/emisión de forma “cuasi” simultánea en el modo “multi-λ”.

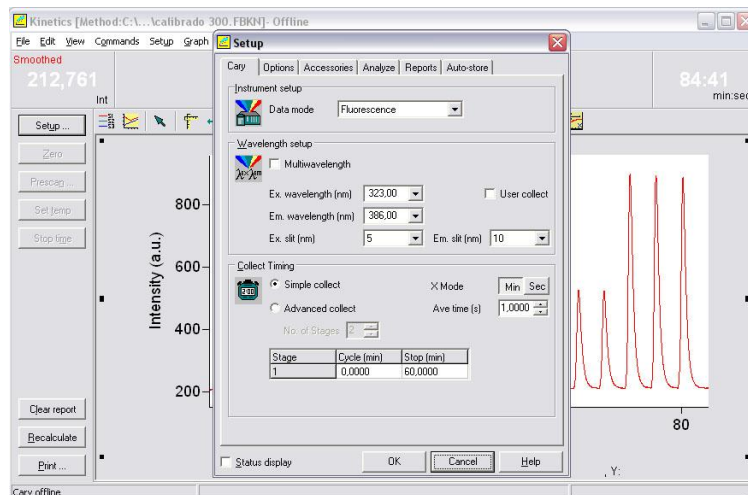


Figura II.7. Espectrofluorímetro “Varian Cary Eclipse” e interfaz de usuario del software correspondiente

Con el uso de este equipo la cubeta empleada fue una célula de flujo “Hellma 176.052-QS” para fluorimetría, de 25 μL de volumen interno y con un paso óptico de 1.5 mm, colocada dentro del compartimento de detección. La célula es un prisma rectangular de base cuadrada para posibilitar la emisión en un ángulo de 90° respecto a la radiación de excitación incidente (*Figura II.8*).

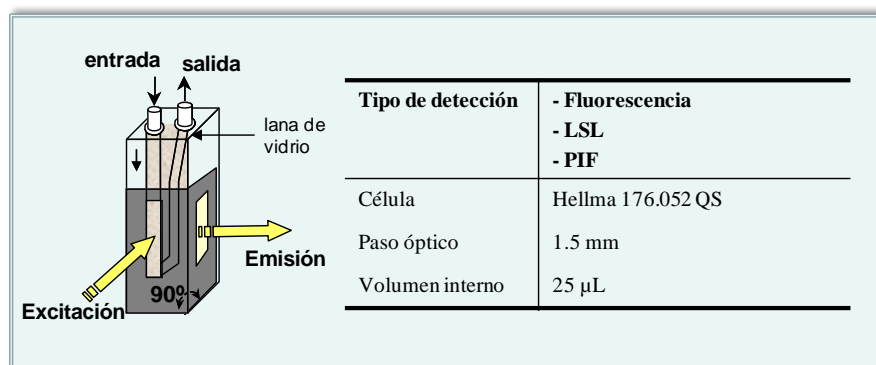


Figura II.8. Célula empleada para detección de fluorescencia

✓ En el caso de detección quimioluminiscente, se empleó un luminómetro desarrollado en nuestro laboratorio. El módulo fotosensor, H8249-101, se obtuvo de Hamamatsu (sales.hamamatsu.com) y consistía en un tubo fotomultiplicador de 28 mm de diámetro, un circuito de alimentación de alto voltaje y un amplificador de bajo ruido con una respuesta espectral entre 185 y 900 nm. Los datos se registraron utilizando el software VI Data Logging (Nacional Software). En este caso se empleó una célula de flujo Hellma 138-QS (Figura II.9) adherida al módulo fotosensor de 50 µL de volumen interno y con un paso óptico de 1.0 mm. Tanto el módulo fotosensor como la célula de flujo se encontraban encerrados en el interior de una caja opaca a la luz y envuelta con tela negra construida de manera casera en nuestro propio laboratorio. La célula estaba colocada delante de la ventana del módulo fotosensor, con un área efectiva de 4 x 20 mm. Un pequeño espejo era colocado en la parte posterior de la célula con el fin de recoger toda la luz emitida.

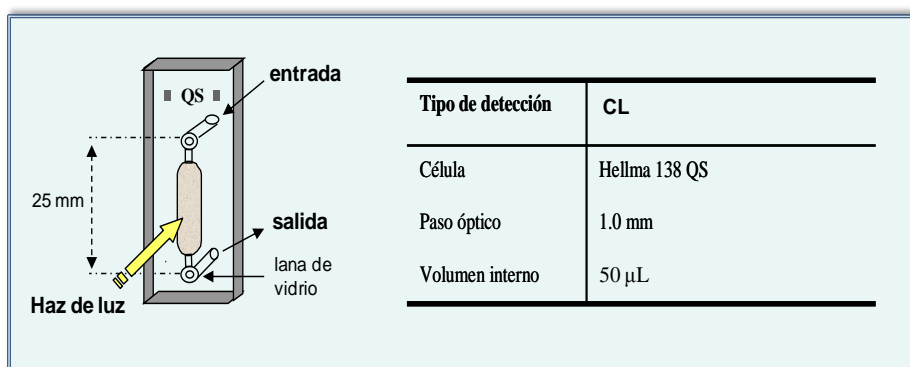


Figura II.9. Célula empleada para detección quimioluminiscente

2. Optimización de las variables de la unidad de retención/detección

2.1. Elección del soporte sólido

Primeramente, se realizó una serie de estudios preliminares ensayando diferentes soportes sólidos, de acuerdo a la naturaleza de la especie a determinar, y se escogieron los que originaban una mayor señal analítica en cada caso. En los optosensores basados en PIF, en algunos casos se desconocía la naturaleza del fotoproducto o fotoproductos generados y, por tanto, lo apropiado era ensayar soportes sólidos de diferente naturaleza. En el resto de optosensores, en los que sí se conocía la naturaleza y carga del analito (en su caso), era posible a priori prever el tipo de soporte a ensayar. A continuación se discutirá la optimización para el caso de los cuatro optosensores seleccionados.

- *Cromolín*

Este analito se determinó mediante LSL con Tb (III). En esta técnica la energía transferida entre el analito (ligando) y el ión lantánido viene determinada por la naturaleza de ambos, del enlace ligando-ión y del disolvente. La diferencia energética entre el nivel excitado y el nivel fundamental del ion lantánido y la rigidez de la estructura molecular contribuyen a un aumento de la intensidad de luminiscencia del sistema. Por lo tanto, era fundamental una buena elección del soporte sólido utilizado para la retención del complejo Tb(III)-SCG con el fin de proporcionar la rigidez necesaria al sistema, evitando así el uso de surfactantes. Se ensayaron tres soportes sólidos de intercambio catiónico (Sephadex SPC-25, Sephadex CM C-25 and Chelex-100), uno de intercambio aniónico (Sephadex QAE A-25) y uno de naturaleza no iónica (gel de sílice C₁₈) y sólo se obtuvo señal en el caso de los de intercambio catiónico, siendo la mayor señal la obtenida usando Chelex-100. Por consiguiente, este último soporte fue elegido como zona sensora.

- *Cefadroxilo*

En este caso la determinación del CFD estaba basada en la medida de CL generada tras su reacción con permanganato en medio ácido. A fin de reducir el consumo de reactivos, la reacción entre CFD y permanganato para la generación de CL tenía lugar sobre un soporte sólido colocado en la célula de flujo y por ello era necesaria la retención de ambos compuestos sobre el mismo. El estudio del soporte sólido se llevó a cabo haciendo uso de una disolución 0.4 M de ácido sulfúrico como disolución portadora, ya que era necesario un medio ácido para obtener la reacción quimioluminiscente. Se probaron diferentes soportes sólidos introduciendo las disoluciones de CFD y permanganato en diferente orden en el sistema. Las resinas de intercambio catiónico (Sephadex SP C-25) y de naturaleza no iónica (gel de sílice C₁₈) no proporcionaron señal

independientemente del orden de inserción de las disoluciones. Como era de esperar, en el caso de los soportes de intercambio aniónico (Sephadex QAE A-25 y DEAE A-25) se obtuvieron buenas señales analíticas aunque sólo cuando el permanganato se introducía en el sistema en primer lugar. Esto puede explicarse teniendo en cuenta la carga del ión permanganato que hace que éste sea fuertemente retenido sobre intercambiadores aniónicos, mientras que el CFD es retenido débilmente. De los dos soportes sólidos de intercambio aniónico probados el que mayor sensibilidad proporcionó fue Sephadex QAE A-25 respecto al de Sephadex DEAE A-25 (un incremento del 25%), siendo por lo tanto elegido para el desarrollo del sensor.

- *Resveratrol/Piceido*

En el caso de la determinación simultánea de RVT y PCD se hacía necesaria su separación on-line antes de la llegada a la zona de detección. Con este propósito se empleó como estrategia el uso de una minicolumna rellena con un soporte sólido adecuado.

Como se comentó previamente en la Introducción (apartado 6.2.1), tanto el RVT como el PCD se encuentran en las muestras reales en forma de isómeros *cis* y *trans*, siendo ambos débilmente fluorescentes. No obstante, la determinación de estos compuestos por fluorimetría convencional no es posible debido a la imposibilidad de distinguir entre ambos isómeros. Por otra parte, la irradiación UV intensa de disoluciones etanólicas o hidroetanólicas de *trans*-RVT y *trans*-PCD origina su fotoconversión primero en los correspondientes isómeros *cis* y posteriormente en fotoproductos fuertemente fluorescentes¹⁷⁰, siendo por tanto posible la determinación total de RVT y PCD (isómero *cis* más isómero *trans*) mediante PIF. Esta fue por tanto la técnica de detección seleccionada tanto para su determinación conjunta como individual en esta Memoria.

Se realizó un amplio estudio de la retención de ambos compuestos y sus fotoproductos sobre diferentes tipos de soportes sólidos, colocando la minicolumna antes o después del fotorreactor. Se probó con resinas de intercambio aniónico (Sephadex QAE A-25 y Sephadex DEAE A-25), de intercambio catiónico (Sephadex SP C-25 y Sephadex CM C-25) y de naturaleza no iónica (gel de sílice C₁₈). Los ensayos mostraron que la retención de *trans*-RVT, *trans*-PCD y sus fotoproductos era posible tanto en resinas de intercambio aniónico como en gel de sílice C₁₈, aunque sólo en este último caso se observó diferencia en el comportamiento cinético de retención/elución de las distintas especies. Además, únicamente en el caso de los fotoproductos esta diferencia en el comportamiento cinético era suficiente como para permitir su llegada secuencial a la zona de detección. Con este propósito se estudió la cantidad de gel de sílice C₁₈ óptima para rellenar la minicolumna, seleccionando la mínima cantidad de éste que permitiese la separación completa de los fotoproductos. Cantidades superiores originarían un aumento en el

tiempo de pico, disminuyendo por tanto la frecuencia de muestreo. A continuación se muestra el diagrama correspondiente al estudio de esta variable (*Figura II.10*).

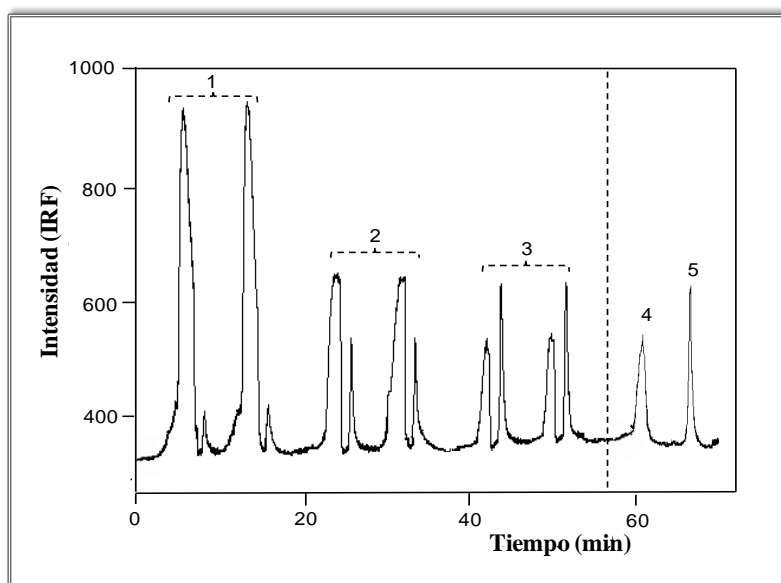


Figura II.10. Diagrama del estudio de la influencia de la cantidad de C_{18} sílica gel ubicada en la minicolumna, sobre la separación de PCD y RVT ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$). (1) 25 mg; (2) 60 mg; (3) 120 mg; (4) PCD sin minicolumna; (5) RVT sin minicolumna. En 1, 2 y 3 el primer y segundo pico corresponden a PCD y RVT, respectivamente.

La cantidad de soporte sólido elegido fue 120 mg. Como puede observarse en la *Figura II.10*, para cantidades menores a ésta se producía un solapamiento de las señales analíticas de los fotoproductos de RVT y PCD.

Puesto que el soporte sólido gel de sílice C_{18} era el que proporcionaba una mayor discriminación para las dos especies monitorizadas, este fue el utilizado también en la zona de detección.

Con la estrategia utilizada, los fotoproductos fluorescentes generados on-line eran retenidos transitoriamente sobre gel de sílice C_{18} en la minicolumna pero el fotoproducto del *trans*-PCD alcanzaba el detector antes que el fotoproducto del *trans*-RVT, lo que hacía posible la determinación simultánea de ambos compuestos con una sola inyección de muestra.

- *Bisfenol A*

Este analito fue determinado mediante la medida de su fluorescencia nativa. Teniendo en cuenta su estructura, se llevaron a cabo en primer lugar estudios de retención del BPA sobre resinas de intercambio catiónico (Sephadex SP C-25 y Chelex-100) y aniónico (Sephadex QAE A-25 y Sephadex DEAE A-25) a diferentes valores de pH. En el caso de las resinas catiónicas, la

señal analítica obtenida fue muy baja debido a que su retención era muy débil. Sin embargo, el BPA pudo ser ionizado y retenido en ambas resinas de intercambio aniónico a través de sus grupos hidroxilo a valores elevados de pH, ya que presenta un pK_a de 10.3. No obstante, el pH necesario para la retención era demasiado alto y se encontraba tan cerca del límite de trabajo de las resinas de este tipo (alrededor de 11.0) que fue imposible llevar a cabo la retención y hubo que descartar su uso. Se procedió por tanto a ensayar la retención del analito sobre gel de sílice C_{18} , observándose la retención y posterior elución del mismo. Dicho soporte fue finalmente elegido para el desarrollo del sensor.

A continuación se muestra una tabla que incluye el soporte sólido y el tipo de célula utilizado para cada uno de los ocho optosensores puestos a punto en esta Memoria.

Tabla II.1. Soportes sólidos y tipos de células de flujo empleados para cada optosensor

Optosensor	Soporte sólido	Célula
SCG	Chelex 100	Hellma 176.052 QS
CFD	Sephadex QAE A-25	Hellma 138 QS
INM	Sephadex QAE A-25	Hellma 176.052 QS
RVT	Sephadex QAE A-25	Hellma 176.052 QS
PCD	Sephadex QAE A-25	Hellma 176.052 QS
RVT/PCD	Gel de sílice C_{18}	Hellma 176.052 QS
AFB1	Gel de sílice C_{18}	Hellma 176.052 QS
BPA	Gel de sílice C_{18}	Hellma 176.052 QS

2.2. Características espectrales

Se estudiaron a continuación las características espectrales de las especies a monitorizar una vez retenidas en el soporte sólido. Para estudiar los espectros de excitación y emisión de fluorescencia en fase sólida se insertó en el sistema de flujo una disolución estándar del analito y, una vez que la señal de fluorescencia monitorizada fue máxima, se detuvo el flujo.

- *Cromolín*

Se realizaron los espectros de excitación y emisión para el complejo formado por el analito y el ión Tb (III) una vez retenido sobre el soporte sólido, Chelex-100. Las medidas analíticas se

realizaron con un tiempo de retardo de 0.1 ms. En LSL la emisión es producida por el ión Tb (III) una vez que se une al analito; las tres bandas características de emisión se observan a 490, 545 y 590 nm, correspondiendo a las transiciones $^5D_4 \rightarrow ^7F_6$, $^5D_4 \rightarrow ^7F_5$ y $^5D_4 \rightarrow ^7F_4$, respectivamente. La segunda transición, es decir, la correspondiente a 545 nm, es la más intensa y, por tanto, es usualmente la elegida para este tipo de detección.

En la *Figura II.11* se puede observar que el complejo Tb (III)-SCG tiene dos bandas de excitación. La banda situada a 336 nm no solo es más intensa que la correspondiente a 230 nm sino que además, la señal neta (señal del complejo menos señal del blanco), es mayor escogiendo dicha longitud de onda. Por lo tanto, las longitudes de onda de medida seleccionadas fueron 336 y 545 nm ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$).

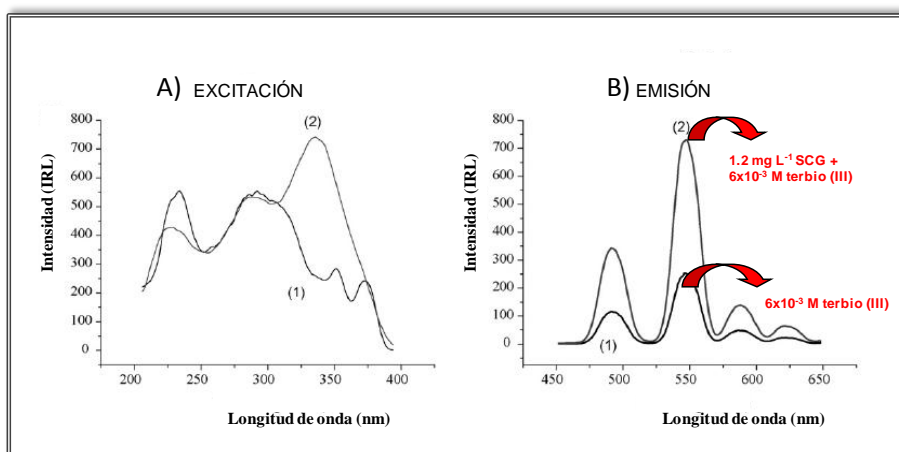


Figura II.11. Espectros de luminiscencia de SCG sobre Chelex-100: **A.** Excitación ($\lambda_{em}=545$ nm): (1) Tb (III) y (2) complejo Tb (III)-SCG; **B.** Emisión ($\lambda_{ex}=336$ nm): (1) Tb (III) y (2) complejo Tb (III)-SCG.

Cuando se trabaja en LSL, normalmente se requiere del uso de reactivos surfactantes para mejorar la rigidez del sistema y completar la esfera de coordinación del Tb (III). Sin embargo, en nuestro caso, el uso de un soporte sólido permite obtener una sensibilidad similar evitando el uso de estos compuestos adicionales. Concretamente, con el uso de Chelex-100 como soporte sólido se consiguió un aumento en la sensibilidad cercano al 80% en comparación con la señal analítica obtenida en disolución.

- *Cefadroxilo*

Dado que en CL no se lleva a cabo la excitación del analito mediante radiación electromagnética sino que esta se produce por la energía generada mediante una reacción química, no fue necesario realizar los espectros de excitación y emisión. La respuesta espectral se midió en un rango de 185-900 nm.

- *Resveratrol/Piceido*

En la *Figura II.12* se muestran los espectros de los fotoproductos del *trans*-RVT y *trans*-PCD en disolución acuosa y retenidos en C₁₈ sílica gel. Las longitudes de onda de medida óptimas son 257/382 nm ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$) para el fotoproducto del *trans*-PCD y 277/382 nm ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$) para el fotoproducto del *trans*-RVT. Como puede observarse, el solapamiento espectral hacía imposible su determinación simultánea sin una previa separación.

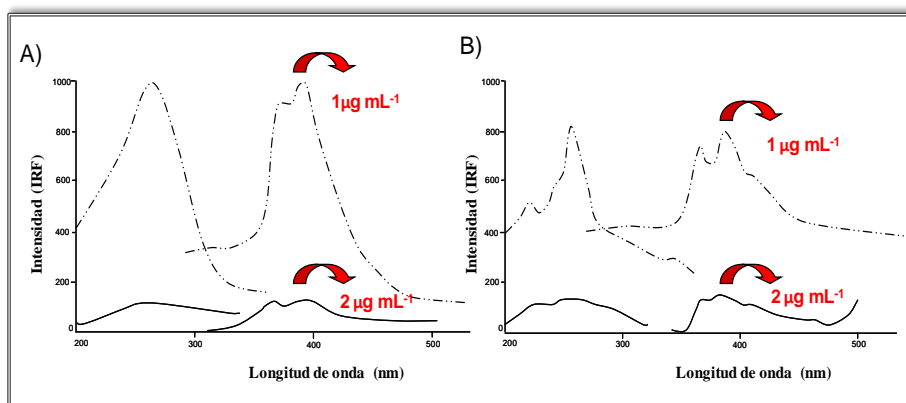


Figura II.12. Espectros de fluorescencia de excitación y de emisión en disolución acuosa (línea continua) y en C₁₈ sílica gel (línea discontinua) de los fotoproductos de: (A) *trans*-RVT y (B) *trans*-PCD.

Teniendo en cuenta que la sensibilidad para la determinación de PCD era menor que para el RVT, se eligieron como longitudes de onda de trabajo las óptimas para la determinación de PCD (257/382 nm). En ambos casos la retención de los fotoproductos en el soporte sólido proporcionaba un incremento importante en la señal analítica cuando se comparaba con los espectros obtenidos en disolución acuosa bajo las mismas condiciones (8 y 12 veces mayor para *trans*-PCD y *trans*-RVT, respectivamente).

- *Bisfenol A*

Se registraron los espectros de excitación y emisión del BPA tanto en disolución acuosa como en fase sólida (C₁₈ sílica gel) (*Figura II.13*). El espectro de fluorescencia, en ambos casos, muestra dos máximos de excitación (221 y 271 nm) y un máximo de emisión a 305 nm, siendo la intensidad de fluorescencia del analito retenido en el soporte sólido muy superior a la correspondiente en disolución acuosa para $\lambda_{\text{ex}} = 271$ nm. Para una longitud de onda de excitación de 221 nm la señal de fondo generada por el soporte sólido era tan alta que impedía llevar a cabo las medidas analíticas. Se seleccionaron por tanto como longitudes de onda de medida 271/305 nm

($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$), obteniéndose un incremento en la señal analítica de 33 veces en comparación con los espectros registrados en disolución.

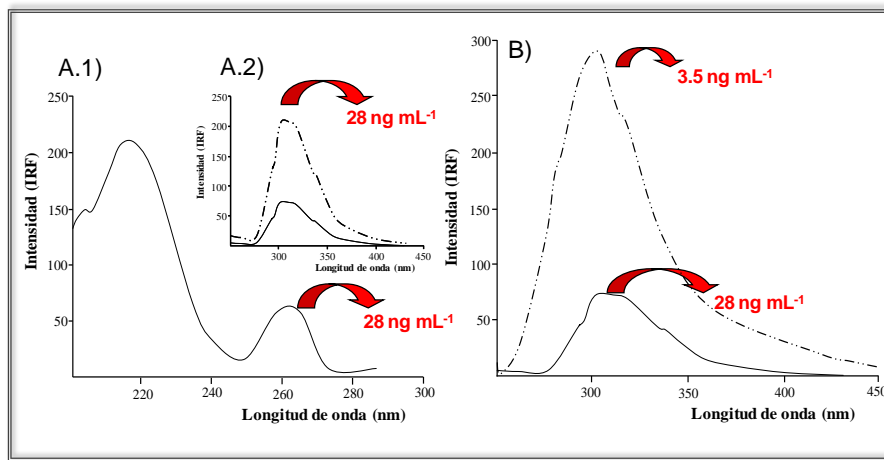


Figura II.13. Espectros de fluorescencia del BPA: **(A.1)** excitación en disolución ($\lambda_{em}=305$ nm); **(A.2)** emisión en disolución ($\lambda_{ex}=221$ y 271 nm, línea discontinua y línea continua, respectivamente); **(B)** emisión ($\lambda_{ex}=271$ nm) en disolución (línea continua) y retenido en C₁₈ sílica gel (línea discontinua).

A continuación se muestra una tabla que resume las longitudes de onda de excitación y de emisión elegidas para la medida de la señal analítica en los ocho optosensores desarrollados en esta Memoria.

Tabla II.2. $\lambda_{exc/em}$ escogidas para cada optosensor

Optosensor	λ_{exc} (nm)	λ_{em} (nm)
SCG	336	545
CFD	-	185-900
INM	283	371
RVT	277	382
PCD	257	382
RVT/PCD	257	382
AFB1	353	424
BPA	271	305

3. Optimización de las variables instrumentales

Dado que los optosensores desarrollados en esta Memoria se basan en detección luminiscente, es necesario optimizar variables instrumentales tales como la anchura de las rendijas de excitación y emisión, el voltaje del tubo fotomultiplicador y los tiempos de retardo y de medida (en el caso de LSL).

El estudio de la influencia de la anchura de las rendijas de excitación y emisión sobre la señal analítica se llevó a cabo, en todos los casos excepto en el sensor para la determinación de CFD, dado que en éste se empleó CL como técnica de detección. Para ello se inyectó un volumen de analito en el sistema, y se estudió la intensidad de la señal obtenida a distintos valores de anchura de rendijas. Para estudiar la influencia de la anchura de las rendijas en la señal analítica, se estableció un valor fijo (5, 10 ó 20 nm) para la rendija de excitación y se fue variando la apertura de la rendija de emisión (5, 10 y 20 nm). Para todos los pares de valores experimentados se mantuvo un mismo valor de emisión del soporte sólido, lo cual fue posible estableciendo el valor de voltaje necesario en cada caso para tal fin. El criterio utilizado para seleccionar una pareja de valores de rendijas de excitación/emisión fue que la relación entre el valor de la señal de fluorescencia y el de la señal de fondo fuera el más alto posible, sin que el valor del fondo sobrepasara las 250 unidades de fluorescencia (midiendo entre 0 y 1000). De este modo habría un rango amplio que permitiera medir la luminiscencia debida exclusivamente al analito (o producto de reacción).

La influencia del voltaje del tubo fotomultiplicador es una variable crítica en todos los sensores desarrollados. Como norma general al aumentar el voltaje se produce un aumento en la señal luminiscente en todos los casos (para un mismo valor de rendijas). Finalmente se llegó a una situación de compromiso entre voltaje y anchura de rendijas, escogiendo aquellos valores que proporcionaban la mayor señal neta. A modo de ejemplo, se muestra en la tabla *Tabla II.3* los valores ensayados para el caso de la determinación de BPA.

En el caso de usar detección quimioluminiscente, el aumento de la ganancia del tubo fotomultiplicador no influye en la señal producida por el soporte sólido, pero sí que produce una disminución en la repetitividad del sistema. Por consiguiente, se escogerá la máxima ganancia posible (para aumentar la señal debido al analito) que nos permita una buena repetitividad.

En el caso de LSL se emplea como tiempo de retardo 0.1 ms, tiempo suficiente para eliminar la señal de fluorescencia y, a la vez, obtener la máxima señal analítica, puesto que conforme pasa el tiempo la señal de luminiscencia va disminuyendo. Por otro lado, se observaba el máximo de señal de luminiscencia empleando un tiempo de medida de 3 ó 4 ms.

En la tabla siguiente se muestran, a modo de ejemplo, los resultados obtenidos en la optimización de las variables instrumentales en el sensor para la determinación de BPA.

Tabla II.3. Estudio conjunto de rendijas y voltaje para el BPA

R_{exc}	R_{em} (5 nm)		R_{em} (10 nm)		R_{em} (20 nm)	
	Voltaje	IRF ¹	Voltaje	IRF ¹	Voltaje	IRF ¹
5 nm	835	204	800	182	655	180
10 nm	730	191	720	165	570	196
20 nm	735	212	720	215	550	194

¹ IRF: Intensidad relativa de fluorescencia para BPA

Finalmente, en la *Tabla II.4* se recogen los valores optimizados para las variables instrumentales de los ocho optosensores desarrollados en esta Memoria.

Tabla II.4 Resumen de variables instrumentales optimizadas en cada optosensor

Optosensor	R_{exc}/R_{em}	Tiempo de retardo; Tiempo de medida	V_{PMT} ¹
SCG	10/20	0.1 ms; 3 ms	600-650
CFD	-	-	0.85 ²
INM	10/20	-	625-650
RVT	20/20	-	590
PCD	10/10	-	670
RVT/PCD	10/10	-	590
AFB ₁	10/20	-	630
BPA	20/10	-	720

¹ V_{PMT} : Voltaje del tubo fotomultiplicador (V)

² Ganancia del tubo fotomultiplicador

4. Configuración del sistema de flujo y procedimiento general

En esta sección se describe la configuración de los sistemas de flujo de los cuatro sensores seleccionados así como el procedimiento general llevado a cabo en cada uno de ellos. La configuración del sistema viene determinada por las particularidades de cada sensor, que vienen definidas a su vez por factores tales como técnica de detección, número de analitos a determinar, proceso de elución, reacción derivatizadora, etc.

Los sistemas de flujo utilizados para el desarrollo de los cuatro sensores, que se muestran a continuación, están basados en SIA (SCG) y en MCFIA (BPA, CFD y RVT/PCD).

- *Cromolín*

A continuación se describe la configuración del sistema empleado para la determinación de SCG (*Figura II.14*).

Para el desarrollo de este sensor se hizo uso de una disolución de Tb (III) y una disolución de eluyente adicionales a la propia disolución de la muestra. Como portador se usó una disolución de 0.05 M de tampón de NaAc/HAc (pH 5,9).

Se experimentaron varios procedimientos para la formación del complejo entre el Tb(III) y el analito: (a) formación on-line por aspiración secuencial de Tb(III) y la disolución de muestra; (b) formación on-line por aspiración de ambas disoluciones en modo de *sandwich* y (c) formación off-line por adición directa de Tb(III) a la disolución de muestra. Finalmente, se escogió como óptimo el segundo de los casos, ya que era el más rápido y el que mejores señales analíticas proporcionaba debido esto último a una mejor mezcla entre ambas disoluciones y por lo tanto una más eficiente formación de complejo.

En primer lugar se aspiraban de manera secuencial, en modo de doble *sandwich*, dos alícuotas de la disolución de muestra y dos alícuotas de la disolución de Tb (III) ($6 \times 10^{-3} \text{M}$). El volumen de muestra de las alícuotas era el mismo (75 μL para muestras de fármacos y 400 μL para muestras de orina). Seguidamente se aspiraban 1000 μL de la disolución portadora (0.05 M NaAc/HAc, pH 5,9). Después la mezcla era impulsada hacia la célula de flujo pasando, previamente, por el bucle. Una vez que el complejo Tb(III)-SCG llegaba a la zona sensora (Chelex-100), se registraba la señal analítica correspondiente (336/545 nm). El complejo formado era fuertemente retenido sobre el soporte sólido y por lo tanto fue necesario, para regenerar el mismo, emplear 1 mL de una disolución eluyente de 0.05 M EDTA y, posteriormente, 1 mL de la disolución portadora.

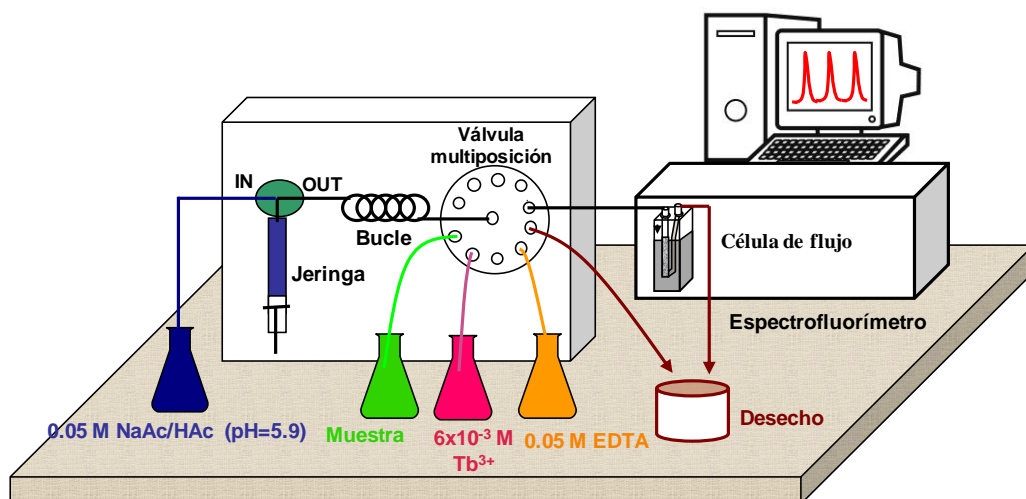


Figura II.14. Sistema SIA empleado para la determinación de SCG. Caudales de aspiración e inyección: 5 y 1.2 mL min⁻¹, respectivamente

A continuación se muestra un diagrama obtenido con este optosensor (*Figura II.15*).

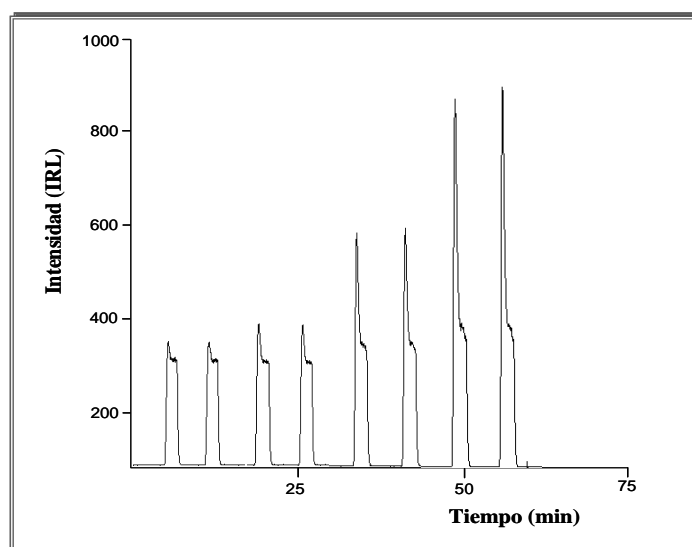


Figura II.15. Diagrama de calibrado para la determinación de SCG. Concentraciones, 0.5, 1, 2 y 4 mg L⁻¹. Volumen inyectado 150 µL

- *Cefadroxilo*

Como se comentó anteriormente, la determinación de CFD se llevó a cabo mediante su oxidación con permanganato en medio ácido en el propio soporte sólido (Sephadex QAE A-25) y medida de la CL generada. Para ello, el permanganato era inmovilizado previamente en el soporte sólido. La configuración utilizada se muestra en la *Figura II.16*.

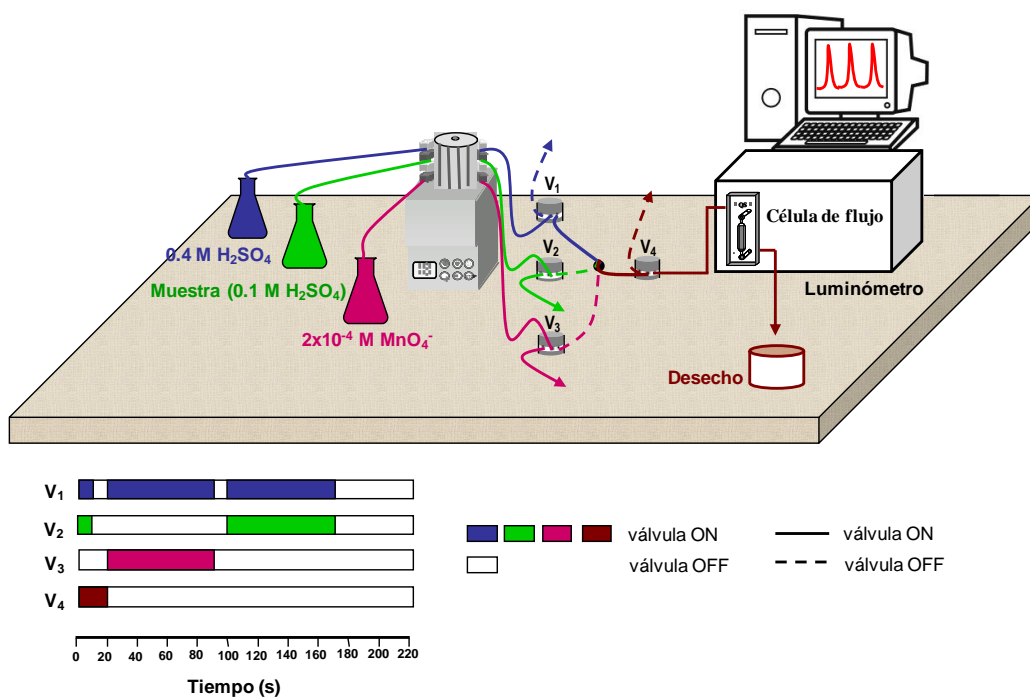


Figura II.16. Sistema MCFIA empleado para la determinación de CFD (caudal 1.3 mL min⁻¹). Esquema de tiempo de las válvulas solenoides de tres vías

En el sistema inicialmente todas las válvulas se encuentran desactivadas y la disolución portadora (0.4 M H₂SO₄) fluye hacia la célula de flujo, mientras que las otras disoluciones son recirculadas hacia sus recipientes. Después las válvulas V₁, V₂ y V₄ son activadas durante 10, 10 y 20 s, respectivamente, con el propósito de limpiar la porción de tubo comprendida entre los puntos A y B con la nueva disolución de muestra. Seguidamente se introduce la disolución de permanganato (2x10⁻⁴ M) en el sistema por activación de las válvulas V₁ y V₃ durante 70 s. Durante los siguientes 10 s todas las válvulas permanecen desactivadas de nuevo para permitir fluir la disolución portadora hasta el detector, con el objetivo de eliminar el exceso de permanganato del sistema y de que no se produzca una mezcla entre éste y el CFD antes la llegada de este último a la zona de detección. A continuación se activan las válvulas V₁ y V₂ durante 70 s, de manera que la disolución de muestra fluye a través del sistema y se dirige hacia la zona de detección, donde el CFD reacciona con el permanganato retenido en el soporte sólido, obteniéndose la señal analítica. Finalmente, cuando las válvulas vuelven a desactivarse, el soporte sólido es regenerado por la propia disolución portadora.

▪ *Resveratrol y Piceido*

Puesto que se trata de un sensor en el que se determinan dos analitos con una sola inyección de muestra y los fotoproductos generados on-line muestran un alto solapamiento espectral, fue necesario llevar a cabo su separación en el propio sistema de flujo (Figura II.17), tal y como se describió anteriormente.

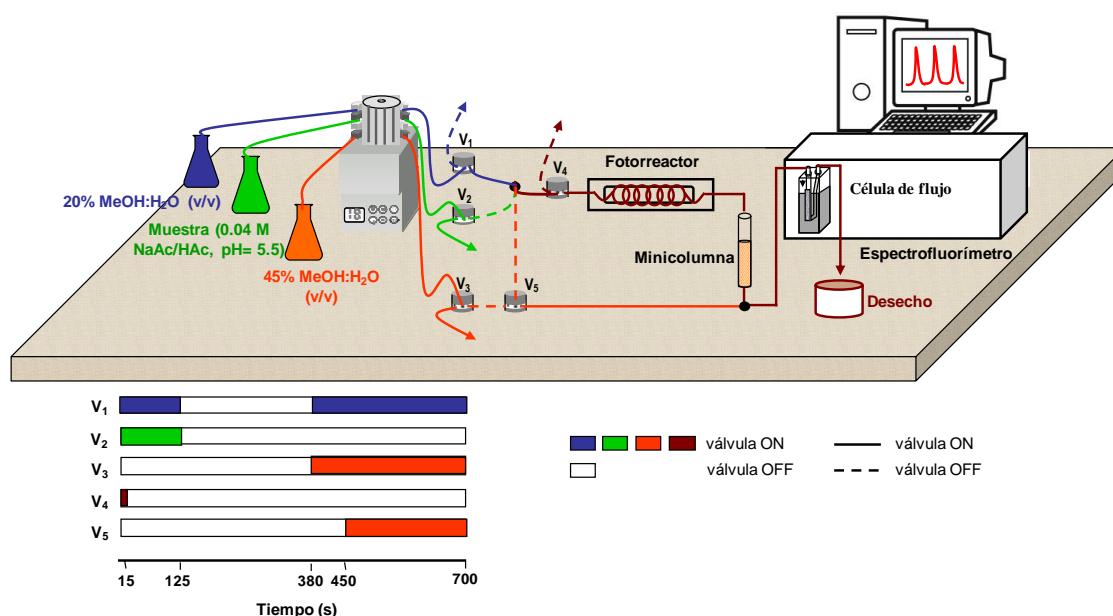


Figura II.17. Sistema MCFIA empleado para la determinación simultánea de RVT y PCD (caudal, 1.1 mL min⁻¹). Esquema de tiempo de las válvulas solenoides de tres vías

Inicialmente todas las válvulas se encuentran desactivadas y el fotorreactor y la bomba peristáltica conectados, de manera que la disolución portadora 1 (20 % MeOH:H₂O (v/v)) fluye a través del sistema hacia el detector, mientras que las disoluciones de muestra y portador 2 (45 % MeOH:H₂O (v/v)) son recirculadas hacia sus correspondientes recipientes, hasta obtener una línea base estable. Se distinguen las siguientes etapas sucesivas:

- *Etapas 1^a (de 0 a 125 s):* las válvulas V₁, V₂ y V₄ son activadas durante 125, 125 y 15 s, respectivamente. De esta manera la disolución de muestra fluye hacia el desecho a través de V₄ durante los primeros 15 s, limpiando la porción de tubo comprendida entre V₂ y V₄. Durante los 110 s restantes la disolución de muestra fluye a través de V₄, atraviesa el fotorreactor y alcanza la minicolumna, donde los fotoproductos del RVT y PCD son retenidos transitoriamente.

- *Etapas 2^a (de 125 a 380 s):* todas las válvulas permanecen desactivadas durante este periodo de tiempo y por lo tanto la disolución portadora 1 vuelve a fluir a través del sistema. Dicha disolución impulsa a la disolución de muestra a través de la minicolumna y la transporta hacia el

detector. Dado que el fotoproducto del PCD es retenido más débilmente que el del RVT de manera transitoria en la minicolumna, alcanza la zona de detección y es monitorizado (257/352 nm). Mientras tanto, el fotoproducto del RVT permanece aún retenido en la minicolumna.

- *Etapa 3^a (de 380 a 700 s):* se activan V_1 y V_3 durante 320 s permitiendo de esta manera la circulación de la solución portadora 2 a través del sistema. Durante los primeros 70 s, esta disolución fluye directamente hacia el detector, contribuyendo a la rápida elución del fotoproducto del PCD. Durante los restantes 250, por activación de V_5 , la disolución portadora 2 circula a través de la minicolumna, originando así una rápida elución del fotoproducto del RVT de la misma, su llegada a la zona de detección y su monitorización.

A continuación se muestra un fiagrama obtenido con este optosensor.

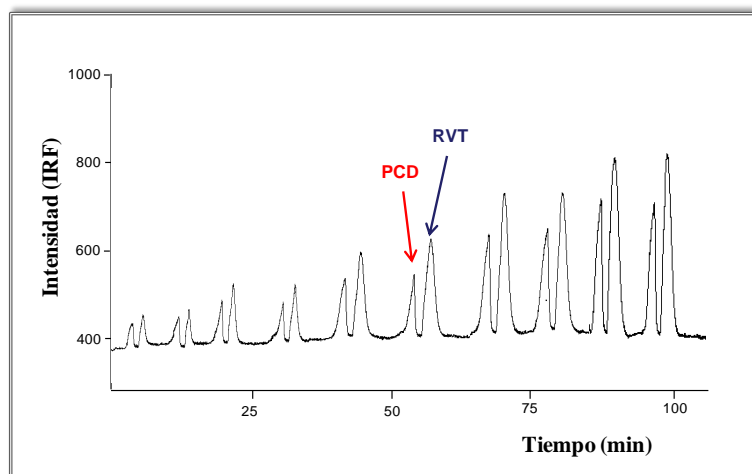


Figura II.18. Fiagrama de calibrado para la determinación simultánea de PCD y RVT. Concentraciones, 0.125, 0.25, 0.50, 0.7 y $1 \mu\text{g mL}^{-1}$. Volumen de inserción de muestra $2146 \mu\text{L}$.

▪ *Bisfenol A*

El sensor propuesto para la determinación de BPA responde al tipo de optosensor en flujo fluorescente más simple que se puede desarrollar: el propio portador actúa como eluyente y la señal analítica se obtiene mediante medida de la fluorescencia nativa del analito. En la *Figura II.19* se muestra el sistema empleado.

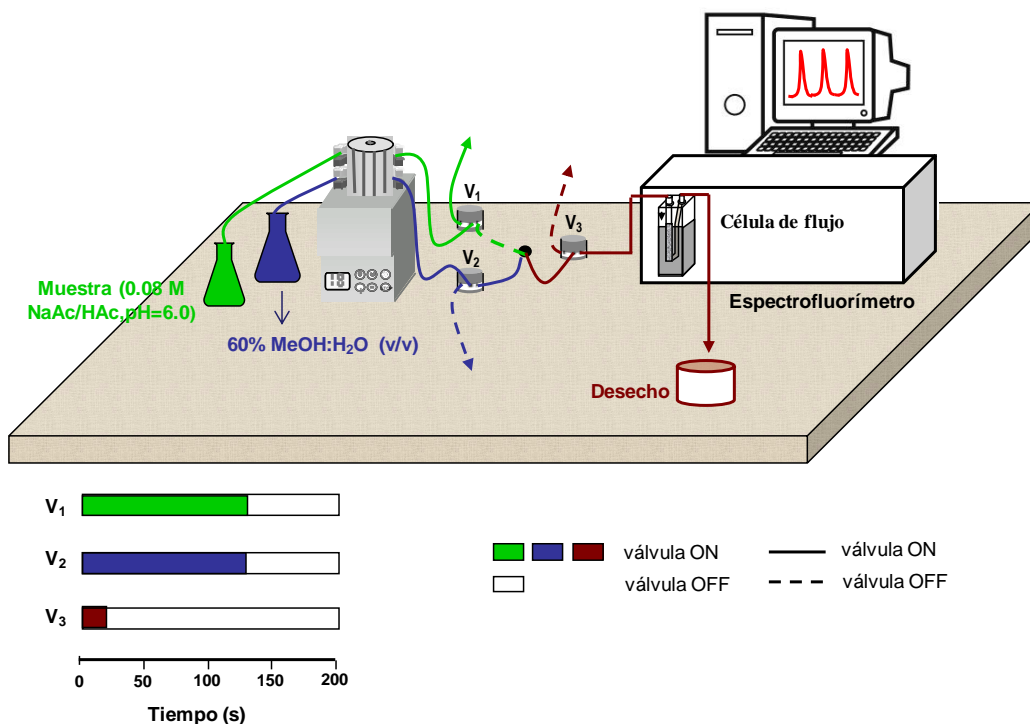


Figura II.19. Sistema MCFIA empleado para la determinación de BPA (caudal, 1.7 mL min^{-1}). Esquema de tiempo de las válvulas solenoides de tres vías

La disolución de muestra es insertada en el sistema tras activar durante 125 s las válvulas V₁ y V₂, de modo que circula a través del sistema mientras que la disolución portadora (60% MeOH:H₂O (v/v)) se recircula hacia su recipiente. La válvula V₃ es activada simultáneamente con V₁ y V₂ durante los primeros 15 s, de modo que el bolo de muestra es dirigido durante este tiempo hacia el desecho a través de dicha válvula. De esta forma se limpia con la nueva muestra la porción de tubo que une la válvula V₁ con la válvula V₃. Durante los restantes 110 s el bolo de muestra es transportado hacia la zona de detección, donde el BPA es retenido de manera transitoria en el soporte sólido (C₁₈ gel de sílice) y monitorizado. El sistema queda preparado entonces para la próxima inserción de muestra.

A continuación se muestra un fiagrama obtenido con este optosensor:

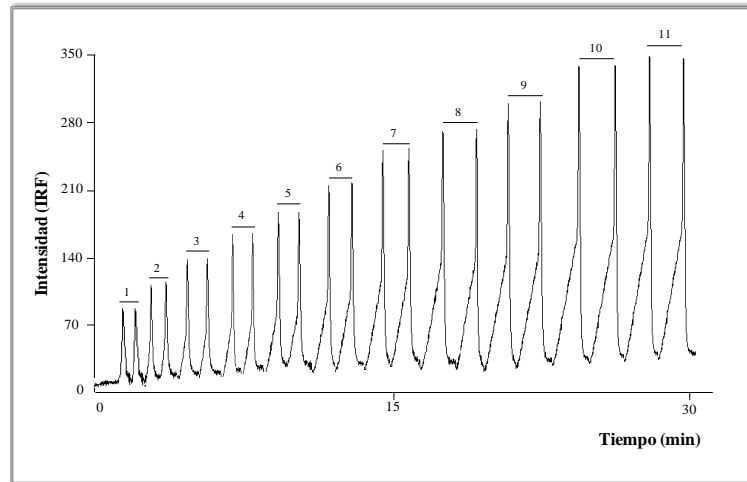


Figura II.20. Diagrama obtenido en la determinación de BPA para tiempos crecientes de inserción de muestra (20-120 s). 4 ng mL^{-1} BPA.

- *Indometacina, Resveratrol, Piceido y Aflatoxina B₁*

A continuación se muestra la configuración del resto de optosensores desarrollados en esta Memoria y ciertas consideraciones importantes de cada uno de ellos:

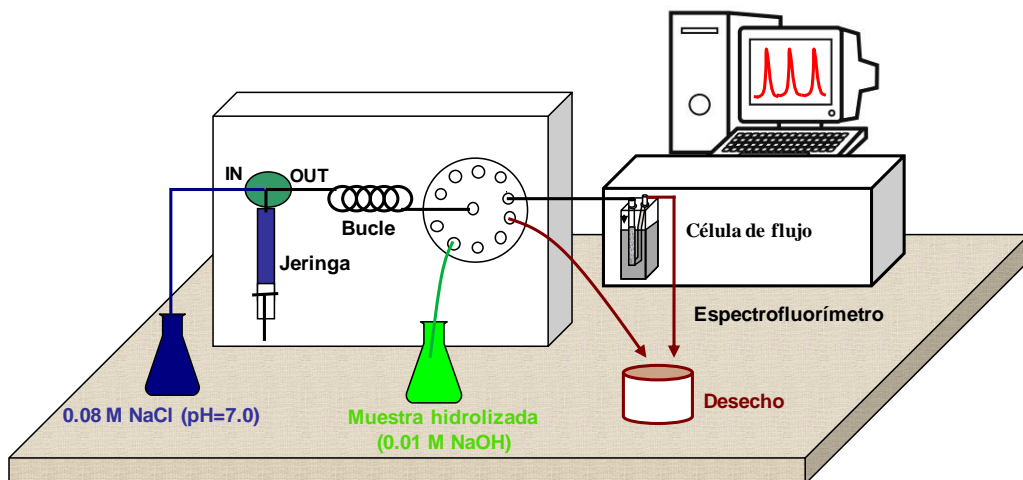


Figura II.21. Sistema SIA empleado para la determinación de INM. Caudales de aspiración e inyección: 5 y 1.5 mL min^{-1} , respectivamente

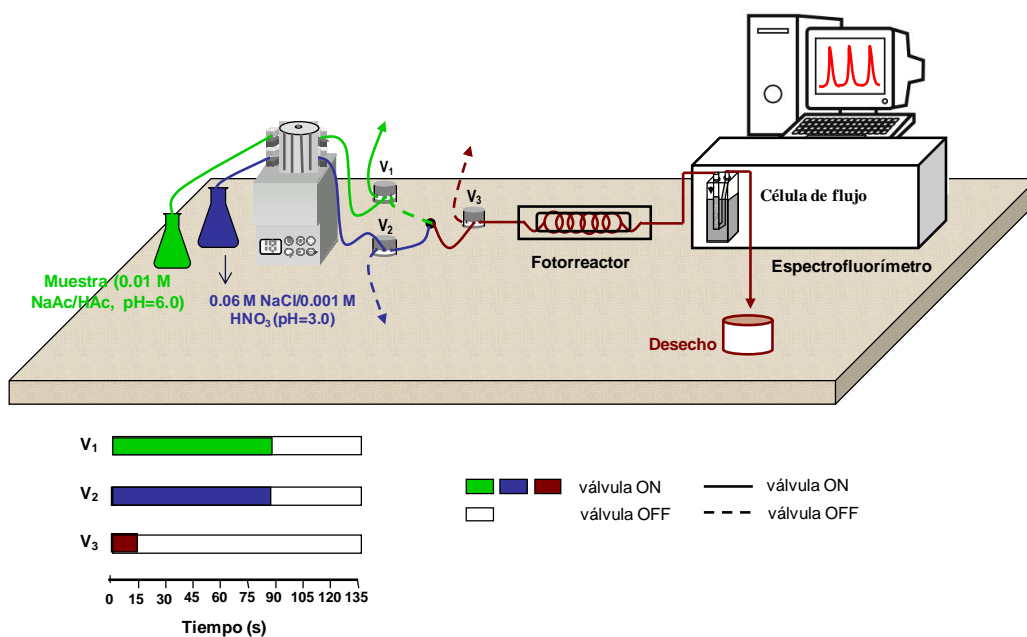


Figura II.22. Sistema MCFIA empleado para la determinación de RVT (caudal, 2.2 mL min⁻¹). Esquema de tiempo de las válvulas solenoides de tres vías

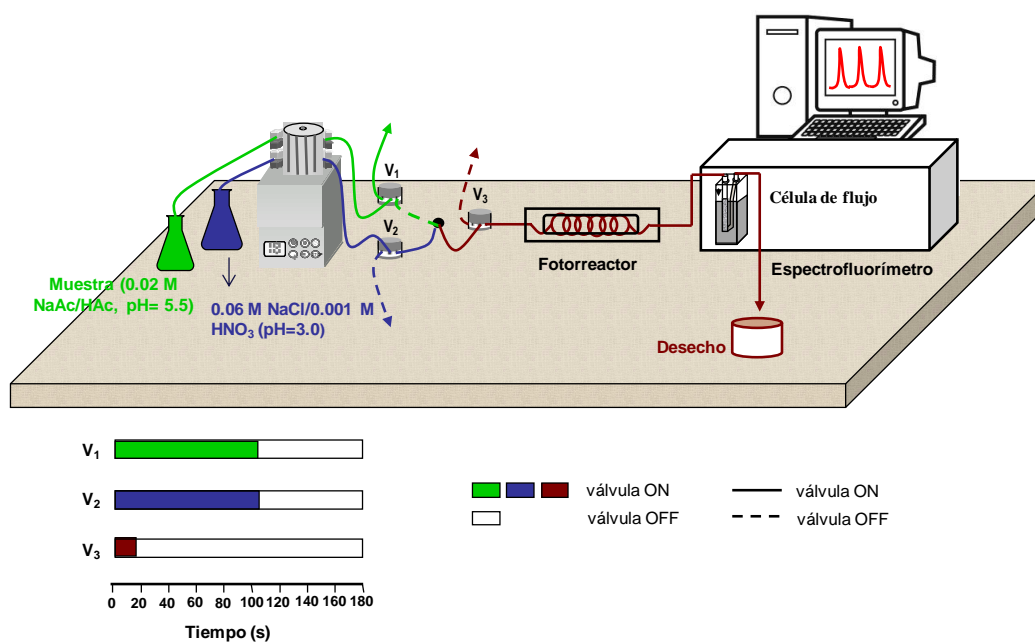


Figura II.23. Sistema MCFIA empleado para la determinación de PCD (caudal, 1.9 mL min⁻¹). Esquema de tiempo de las válvulas solenoides de tres vías

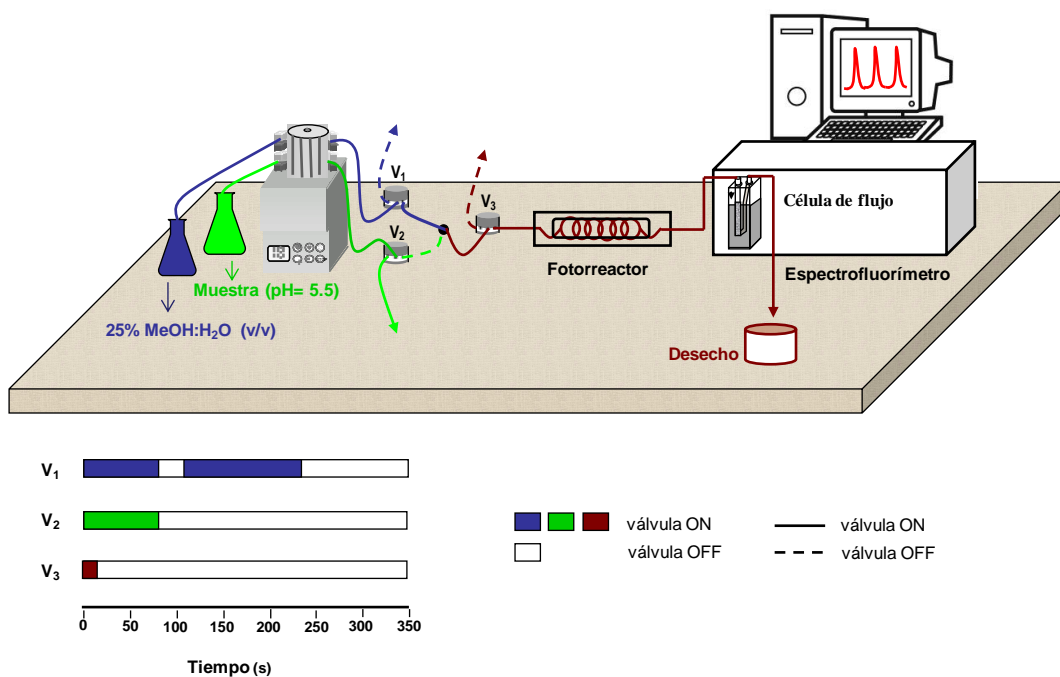


Figura II.24. Sistema MCFIA empleado para la determinación de AFB₁ (caudal, 2 mL min⁻¹). Esquema de tiempo de las válvulas solenoides de tres vías

Para el desarrollo del optosensor de INM (*Figura II.21*) fue necesario llevar a cabo una reacción derivatizadora del analito ya que éste no presenta fluorescencia nativa. Dicha reacción consistió en una hidrólisis alcalina. Una vez formado el producto de reacción éste fue insertado en el sistema, retenido sobre un soporte sólido (Sephadex QAE A-25) en la zona de detección y monitorizado.

En el caso de los otros tres optosensores (RVT, PCD y AFB₁) se hizo uso de PIF y para ello se llevó a cabo la fotodegradación on-line de los analitos sometiéndolos a irradiación UV. Con este propósito fue necesario colocar un fotoreactor justo antes del detector tal y como muestran las *Figuras II.22, II.23 y II.24*. Una vez formados los fotoproductos eran retenidos sobre el soporte sólido correspondiente en la zona de detección y monitorizados.

5. Optimización de las variables químicas

Una vez estudiadas las variables de la unidad de retención/detección y diseñada la configuración del sistema de flujo, se procedió a optimizar las variables químicas que afectaban a cada sensor.

▪ Cromolín

Ya que en este sensor se empleó LSL con Tb (III), hubo que optimizar el rango de pH de la disolución portadora que favorece tanto la formación del complejo como la retención del mismo en el soporte sólido. Teniendo en cuenta el pK_a del grupo hidroxilo del SCG, 1.9, valores de pH más bajos impedirían la formación del complejo Tb (III)-SCG debido a que el grupo hidroxilo no estaría desprotonado. Por otra parte, se comprobó que para valores de pH superiores a 8.0 se producía la hidrólisis del Tb (III) y su consecuente precipitación. Por consiguiente, el pH de la disolución portadora fue investigada en el rango de pH entre 2.0 y 8.0. La señal analítica máxima se obtuvo en el intervalo comprendido entre 5.0 y 6.5 (*Figura II.25*), por lo que se ensayaron a continuación disoluciones tampón de acetato y fosfato en este rango de pH y a diferentes concentraciones (0.01-0.2 M). Para los dos tipos de disoluciones amortiguadoras se observó que un aumento en la concentración provocaba una disminución en la señal analítica a partir de una concentración de 0.05 M, debido a que la fuerza iónica era mayor y esto daba lugar a una menor retención del complejo en el soporte sólido. Los mejores resultados se obtuvieron con la disolución NaAc/HAc, probablemente debido a que la interacción entre los iones fosfato y el Tb (III) dificultaba la formación del complejo Tb (III)-SCG. Finalmente, una disolución tampón 0.05 M de NaAc/HAc (pH 5.9) fue elegida como óptima.

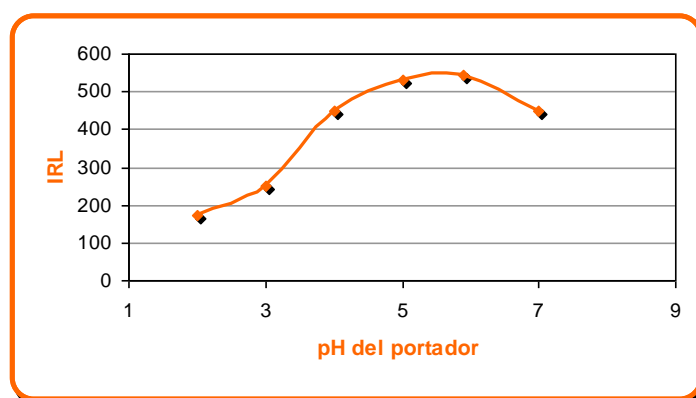


Figura II.25. Influencia del pH de la disolución portadora para la determinación de SCG

La disolución portadora por sí misma causaba una lenta elución del complejo Tb (III)-SCG no consiguiéndose una total elución del mismo en un tiempo apropiado. Por ello fue necesario hacer uso de una disolución eluyente con objeto de conseguir una rápida regeneración del soporte sólido después de la medida analítica. Con este propósito se optó por la elución con EDTA- Na_2 , que forma un complejo ternario, probablemente de naturaleza aniónica²¹⁸, con Tb (III) y SCG, que se eluye fácilmente del soporte sólido. Se probaron diferentes volúmenes y concentraciones de EDTA- Na_2 y finalmente se eligieron como valores óptimos 1000 μL de disolución 0.05 M, ya que daban lugar a una completa regeneración de la zona sensora.

El estudio del pH de la disolución de muestra se llevó a cabo del mismo modo que se ha descrito anteriormente para la disolución de portador. La señal máxima obtenida se encontraba aproximadamente dentro del rango de pH 4.0-7.5 (*Figura II.26*). No fue necesario ajustar el pH de la disolución de las muestras ya que este se encontraba siempre dentro de este rango.

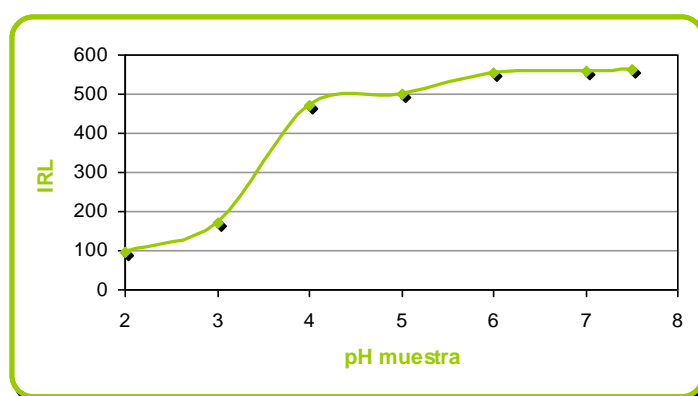


Figura II.26. Influencia del pH de la muestra para la determinación de SCG

La concentración de la disolución de Tb (III) era un factor crítico en este sensor, por lo que se llevó a cabo el estudio de su influencia en la señal analítica. Se probaron concentraciones comprendidas entre 5×10^{-5} y 8×10^{-3} M, observándose que la señal neta de luminiscencia aumentaba con la concentración de Tb (III) hasta un valor de 6×10^{-3} M, manteniéndose constante para concentraciones superiores (*Figura II.27*). Por consiguiente, ésta fue la concentración escogida como óptima.

²¹⁸ A. Ruiz-Medina, E.J. Llorent-Martinez, P. Ortega-Barrales, M.L. Fernández-de Córdova, *Applied Spectroscopy Reviews* 46 (2011) 561-580.

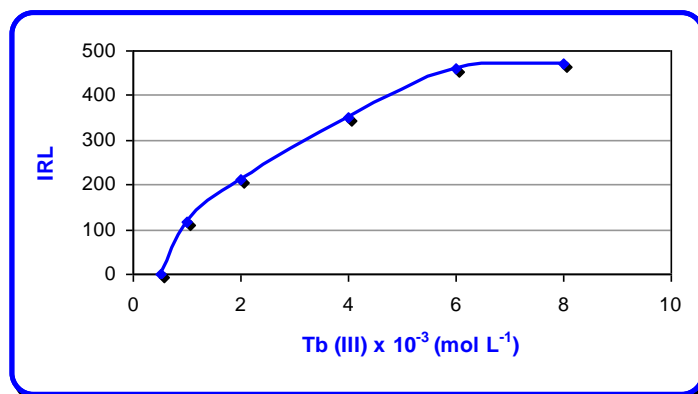


Figura II.27. Influencia de la concentración de Tb (III) para la determinación de SCG

▪ *Cefadroxilo*

La reacción quimioluminiscente entre CFD y permanganato requiere medio ácido²¹⁹. Se comprobó que el ácido que proporcionaba los mejores resultados en cuanto a sensibilidad y repetibilidad era el H₂SO₄, en comparación con otros ácidos como el HNO₃ y el HCl. Para ello se ensayaron disoluciones 0.5 M de estos ácidos. Posteriormente se ensayó la concentración de H₂SO₄ en el rango de 0.2-0.8 M y se observó que la señal analítica aumentaba hasta una concentración de H₂SO₄ 0.4 M, permaneciendo luego prácticamente constante hasta 0.5 M. Como puede observarse en la *Figura II.28*, para concentraciones mayores a 0.5 M la señal analítica decrecía, debido a la existencia de una alta fuerza iónica que impedía la retención del analito en el soporte sólido y por tanto su reacción con el permanganato. En consecuencia, una disolución 0.4 M de H₂SO₄ fue elegida como disolución portadora.

Esta disolución originaba la recuperación completa del soporte sólido por lo que no fue necesario el empleo de una disolución eluyente adicional.

²¹⁹ J.L. Adcock, P.S. Francis, N.W. Barnett, *Analytica Chimica Acta* 601 (2007) 36-67.

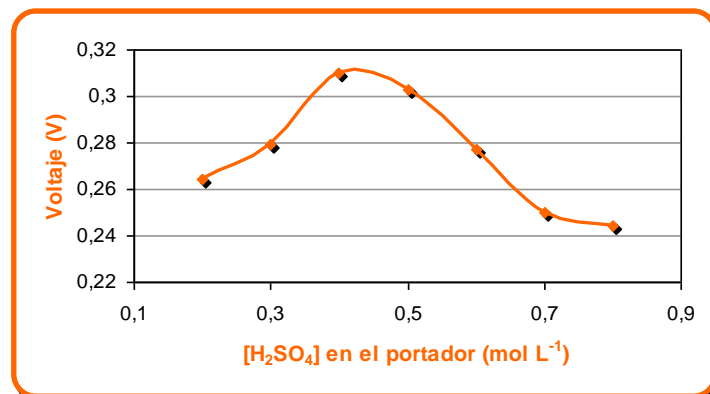


Figura II.28. Influencia de la concentración de H₂SO₄ en la disolución portador/eluyente para la determinación de CFD

De igual forma que para el caso del portador, la disolución de la muestra también requería de medio ácido, obteniéndose un 25% de incremento en la señal analítica cuando el CFD era disuelto en una disolución ligeramente ácida en lugar de en agua desionizada. Utilizando H₂SO₄ para establecer el medio ácido, se comprobó que la señal era prácticamente constante entre 0.1 y 0.3 M, escogiendo finalmente una concentración 0.1 M de H₂SO₄ como óptima, ya que proporcionaba una mejor repetibilidad al método.

Se procedió a continuación a la optimización de la concentración de permanganato. Con las condiciones de portador y disolución de muestra ya optimizadas y empleando una disolución de CFD 110 μM, se varió la concentración del reactivo y se observó un incremento de la señal analítica hasta una concentración de éste de 2×10^{-4} M, permaneciendo prácticamente constante hasta 4×10^{-4} M (Figura II.29). En consecuencia, se seleccionó una disolución 2×10^{-4} M de permanganato.

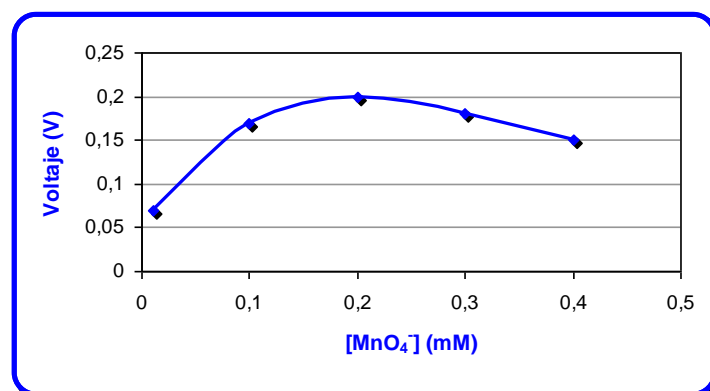


Figura II.29. Influencia de la concentración de permanganato para la determinación de CFD.

- *Resveratrol y Piceido*

Puesto que la resolución de la mezcla RVT-PCD se llevó a cabo on-line mediante la llegada secuencial de sus fotoproductos a la zona sensora, era necesario discriminar suficientemente en el tiempo las señales analíticas de éstos. Por tanto el estudio de la naturaleza de la disolución portadora era un factor clave. Dada la naturaleza no polar del soporte sólido, se probaron disoluciones con diferentes proporciones MeOH:H₂O (v/v) con el objeto de ver la influencia de las mismas sobre la cinética de retención/elución de los fotoproductos. Para tal fin, se estableció como parámetro de comparación el tiempo que transcurría desde que se insertaba el analito en el sistema hasta que aparecía la señal analítica de su fotoproducto (tiempo de arranque). Como puede observarse en la *Figura II.30*, para ambos fotoproductos un aumento en la concentración de MeOH en el portador causa una disminución en el tiempo de arranque. Además, el tiempo de arranque para porcentajes de MeOH inferiores al 40% es mayor para el fotoproducto del *trans*-RVT. A partir de esta concentración, el tiempo de arranque es prácticamente el mismo para los fotoproductos de *trans*-RVT y *trans*-PCD.

Por otra parte, la diferencia entre los tiempos de arranque de las señales analíticas de ambos fotoproductos es constante para disoluciones con una concentración de MeOH del 25% o inferiores a ésta, alcanzándose una mayor frecuencia de muestreo para disoluciones con un 25 y 20% de MeOH.

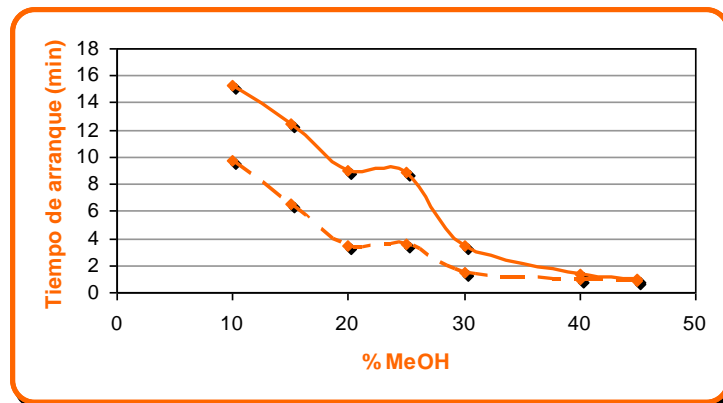


Figura II.30. Influencia del porcentaje de MeOH en la disolución portadora sobre el tiempo de arranque de las señales analíticas del fotoproducto del *trans*-PCD (línea discontinua) y del *trans*-RVT (línea continua). Minicolumna: 120 mg de gel de sílice C₁₈. [*trans*-PCD]= 1 µg mL⁻¹; [*trans*-RVT]= 1 µg mL⁻¹

Se estudió a continuación también la influencia del porcentaje de MeOH de la disolución portadora sobre la intensidad de fluorescencia (*Figura II.31*).

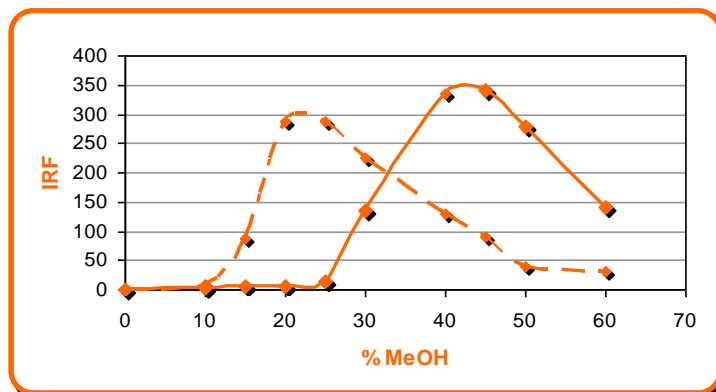


Figura II.31. Influencia del porcentaje de MeOH en la disolución portadora sobre la intensidad de fluorescencia (señal medida a 380 s después de la inyección de muestra) del *trans*-PCD (línea discontinua) y del *trans*-RVT (línea continua). Minicolumna: 120 mg de gel de sílice C₁₈. [*trans*-PCD]= 1 µg mL⁻¹; [*trans*-RVT]= 1 µg mL⁻¹

Para realizar esta experiencia, la señal analítica se midió una vez transcurridos 380 s tras la inyección de muestra. Este tiempo, determinado en la experiencia anterior (*Figura II.30*) correspondía al momento en el que el pico FIA del fotoproducto del *trans*-PCD alcanzaba su máximo cuando se utilizaba como portador una disolución del 20 ó 25% de MeOH. Como se observa en la *Figura II.31*, disoluciones portadoras con un 20 ó 25% MeOH originan la máxima señal fluorescente para el fotoproducto del *trans*-PCD, decreciendo ésta para concentraciones inferiores y superiores. Finalmente, se eligió una disolución portadora 20% MeOH:H₂O (v:v).

Sin embargo, la elución del fotoproducto que era monitorizado en primer lugar, del *trans*-PCD, no era suficientemente rápida como para que se recuperara la línea base antes de la llegada del fotoproducto del *trans*-RVT a la zona de detección, produciéndose un solapamiento de ambas señales (*Figura II.32.A*). Por ello, fue necesario el uso de una segunda disolución portadora, 45% MeOH:H₂O (v:v), que originaba una elución más rápida del fotoproducto del *trans*-PCD y la separación de las señales analíticas de éste y del fotoproducto del *trans*-RVT. El momento para la inserción de esta disolución en el sistema fue estudiado en el rango 345-395 s y se seleccionó un tiempo de 380 s después de la inyección de muestra. Esta disolución circulaba primero durante 70 s directamente hasta el detector sin pasar por la minicolumna, eluyendo rápidamente el fotoproducto del *trans*-PCD. Esto era posible conectando la válvula V₃ del sistema de flujo (ver *Figura II.17*). Después, mediante la conexión de la válvula V₅, la disolución 45% MeOH:H₂O (v:v) circulaba hasta el detector pasando primero a través de la minicolumna. Ello originaba la elución del fotoproducto del *trans*-RVT que aún estaba retenido en esta última, su transporte hasta la zona de detección y el desarrollo de una señal transitoria (*Figura II.32.B*).

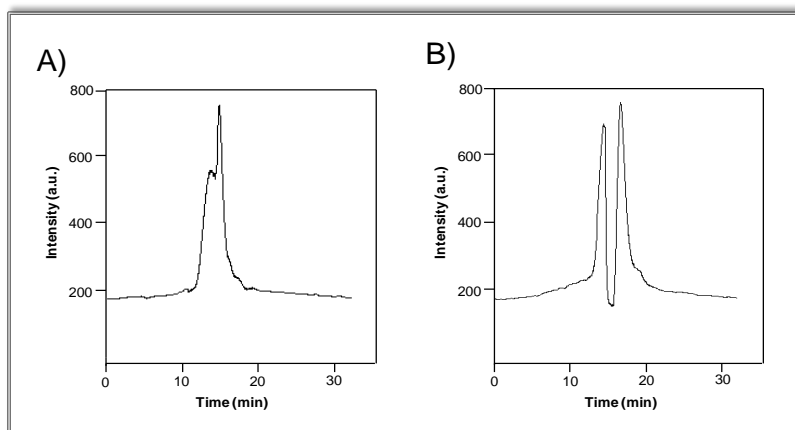


Figura II.32. Señal analítica registrada para los fotoproductos del *trans*-PCD y del *trans*-RVT: (A) con una disolución portadora de 20% MeOH y (B) con una disolución portadora de 20% MeOH e insertando después una disolución portadora de 45% MeOH a los 380 s tras la inyección. 120 mg de gel de sílice C₁₈; [*trans*-PCD]= 1 µg mL⁻¹; [*trans*-RVT]= 1 µg mL⁻¹

Puesto que el pH de la muestra es una variable crítica para la generación de fotoproductos, dicha variable fue estudiada. No se observaron variaciones significativas en las señales fluorescentes de los fotoproductos en el rango de pH ensayado (2.0–7.0). Este resultado era de prever ya que, como previamente se ha descrito en bibliografía^{170, 184}, las especies neutras del *trans*-RVT y *trans*-PCD son las predominantes en medios ácido y neutro y no se observan cambios en sus espectros UV. Por otra parte, se comprobó que para valores de pH superiores a 7.0 se producía un drástico decrecimiento de la señal de fluorescencia. Ya que la diferencia entre los tiempos de arranque de ambos fotoproductos era ligeramente mayor para un pH igual a 5.5, éste fue elegido como óptimo. Se ensayaron diferentes disoluciones tampón para establecer el pH (NaAc/HAc, ácido cítrico/citrato sódico y NaH₂PO₄/Na₂HPO₄) y la que mejores resultados proporcionó resultó ser la de NaAc/HAc. Se estudió su concentración en el rango 0.005-0.06 M y se escogió finalmente una disolución 0.04 M ya que proporcionaba un incremento en la intensidad de fluorescencia de un 20% y 30% para las determinaciones de *trans*-PCD y *trans*-RVT, respectivamente, cuando se comparaba con el uso de disoluciones acuosas.

- *Bisfenol A*

Dada la naturaleza no polar del soporte sólido empleado en el desarrollo de este sensor, gel de sílice C₁₈, se ensayaron como portador disoluciones de MeOH de diferente concentración (10-80%) y se escogió como óptima una disolución 60% MeOH:H₂O (v:v). Se observó que para concentraciones de MeOH inferiores al 60% no se producía la completa elución del analito en un tiempo apropiado, mientras que para concentraciones superiores se obtenía una ligera disminución en la señal de

fluorescencia (*Figura II.33*). Puesto que la disolución portadora seleccionada actuaba además como eluyente, no se necesitó una disolución adicional para la regeneración del soporte sólido.

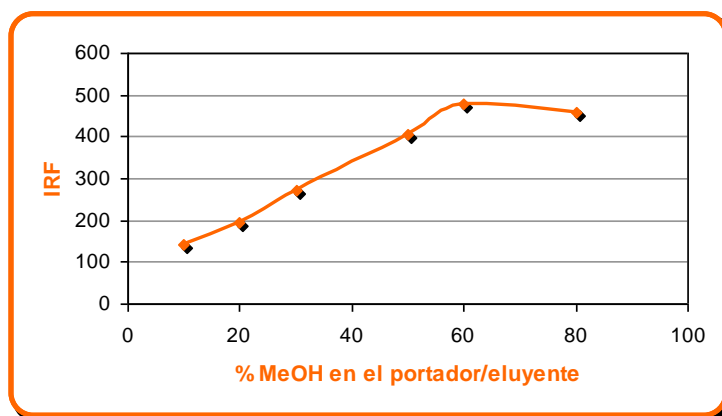


Figura II.33. Influencia de la concentración de MeOH en la disolución portador/eluyente para la determinación de BPA

En este caso, el pH de la muestra se estudió en un amplio intervalo (valores comprendidos entre 2.0 y 9.0), no observándose una variación significativa en la señal fluorescente en dicho rango. Se seleccionó entonces un valor de pH igual a 6.0 puesto que era muy cercano al de las muestras a analizar (leche). Se probaron diferentes disoluciones tampón a pH 6.0 (ácido cítrico/hidróxido sódico, $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ y NaAc/HAc) y se seleccionó una disolución 0.08 M de NaAc/HAc , ya que fue la que permitió una mayor señal analítica (*Figura II.34*).

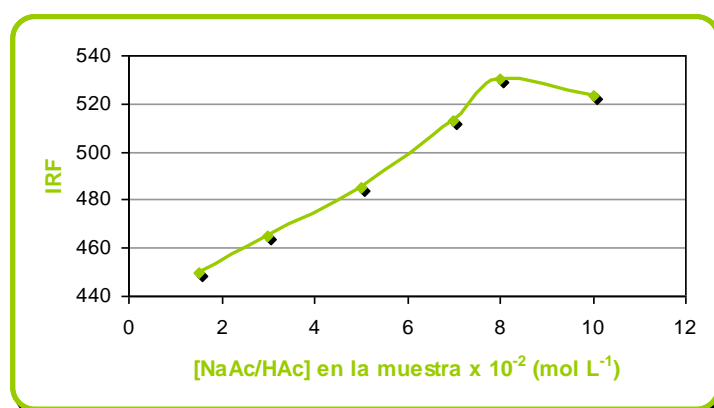


Figura II.34. Influencia de la concentración NaAc/HAc en la muestra para la determinación de BPA

A continuación se muestra una tabla que resume las variables químicas optimizadas para cada uno de los ocho optosensores desarrollados en esta Memoria.

Tabla II.5. Resumen de las variables químicas optimizadas para cada optosensor

Optosensor	Condiciones de la muestra	Disolución portadora	Eluyente	Disoluciones adicionales
SCG	Agua desionizada	0.05 M NaAc/HAc (pH =5.9)	0.05 M EDTA	6×10^{-3} M Tb (III)
CFD	0.1 M H ₂ SO ₄	0.4 M H ₂ SO ₄	-	2×10^{-4} M MnO ₄ ⁻
INM	0.01 M NaOH	0.08 M NaCl (pH=7.0)	-	-
RVT	0.01 M NaAc/HAc (pH =6.0)	0.06 M NaCl/0.001 M HNO ₃ (pH= 3.0)	-	-
PCD	0.02 M NaAc/HAc (pH =5.5)	0.06 M NaCl/0.001 M HNO ₃ (pH= 3.0)	-	-
RVT/PCD	0.04 M NaAc/HAc (pH =5.5)	20% MeOH	45% MeOH	-
AFB ₁	Agua desionizada	25% MeOH	-	-
BPA	0.08 M NaAc/HAc (pH =6.0)	60% MeOH	-	-

6. Optimización de las variables del sistema de flujo

En estas variables se incluye el caudal y el volumen de muestra. A la hora de optimizarlas, hay que considerar las diferencias entre los métodos desarrollados por MCFIA o SIA. Trabajando a un caudal fijo, la cantidad de muestra introducida en el sistema se controla variando el volumen de ésta, en SIA, o el tiempo de inserción, en MCFIA, mediante el software. En ambos casos, la señal analítica aumentará proporcionalmente con la cantidad de muestra introducida en el sistema. No obstante, también se producirá una disminución en la frecuencia de muestreo, por lo que será necesario llegar a un valor de compromiso entre ésta y la señal analítica.

En cuanto al caudal, en los sistemas SIA se establece mediante el software que controla el pistón de la bomba de jeringa. Puesto que es necesario fijar además el valor del volumen de muestra a introducir, es posible variar el caudal sin que varíe la cantidad de muestra introducida en el sistema. En los sistemas MCFIA el caudal se establece a través de la bomba peristáltica, pero en este caso al variar éste aumentará la cantidad de muestra insertada en el sistema si no se varía a la vez el tiempo de inserción. Por ello, en estos sistemas se estableció el caudal máximo posible, sin que se produjeran sobrepresiones, y se estudió después la influencia del volumen de muestra variando para ello el tiempo de inserción.

Por otra parte, en los optosensores desarrollados usando PIF como técnica de detección es necesario tener en cuenta que el tiempo de irradiación es una variable crítica a optimizar, que se establece a través de la longitud del fotorreactor y del caudal. Por ello, aunque el tiempo de irradiación podría considerarse una variable química, dada su estrecha relación con el caudal se va a discutir en esta Sección. Su optimización se ha llevado a cabo en todos los casos del modo siguiente: (1) estando la lámpara UV apagada, se inyectaba un determinado volumen de disolución de analito en el sistema; (2) se detenía el flujo cuando todo el bolo de muestra se encontraba dentro del fotorreactor y se conectaba la lámpara UV durante diferentes tiempos, y (3) se restablecía el flujo y se registraba la señal analítica.

A continuación se describe la optimización de las variables del sistema de flujo.

- *Cromolín*

En este sistema, el caudal fue investigado desde 0.4 hasta 1.8 mL min⁻¹ (usando una disolución de SCG de 1 mg L⁻¹). Se observó que conforme aumentaba el caudal se producía un aumento en la frecuencia de muestreo, y paralelamente una disminución de la señal analítica. Esta última era muy pequeña hasta un valor de 1.2 mL min⁻¹, por lo que éste fue el elegido para la introducción de muestra

y reactivos en el sistema, como compromiso entre sensibilidad y frecuencia de muestreo. Por otro lado, el caudal empleado para la aspiración de las disoluciones en la bomba de jeringa y el reactor fue 5 mL min^{-1} .

En cuanto al volumen de muestra, se ensayó en el intervalo $100\text{-}1200 \mu\text{L}$ y se observó que conforme aumentaba también lo hacía la señal analítica hasta un valor de $800 \mu\text{L}$, debido a la retención de una mayor cantidad del complejo SCG-Tb (III) en la resina (*Figura II.35*). Se eligieron dos volúmenes de muestra en función del tipo de muestra al que aplicar el sensor, 150 y $800 \mu\text{L}$, para preparados farmacéuticos y orina, respectivamente. Ambos proporcionaban la sensibilidad necesaria así como una frecuencia de muestro apropiada. Como se comentó anteriormente, la inserción en el sistema de la muestra y el Tb (III) se llevó a cabo insertando alícuotas iguales de ambos en modo “doble *sandwich*” (SCG-Tb (III)-SCG-Tb (III)).

Se estudiaron también los volúmenes de disolución portadora y de EDTA necesarios para el transporte del complejo SCG-Tb (III) hasta la zona de detección y la regeneración del soporte sólido, respectivamente, y se seleccionó un volumen de $1000 \mu\text{L}$ para ambas disoluciones.

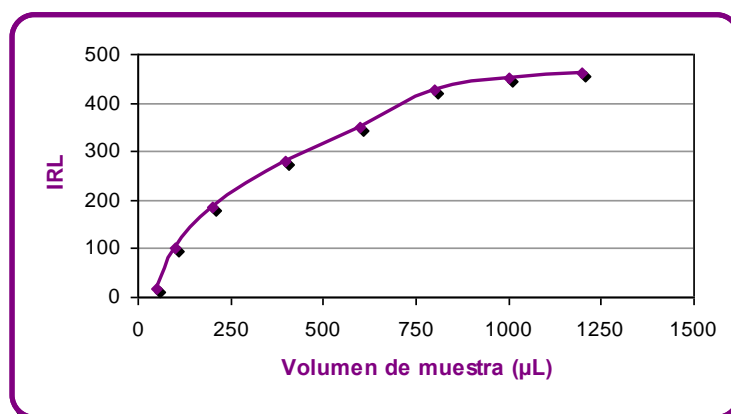


Figura II.35. Influencia del volumen de muestra para la determinación de SCG. $[\text{SCG}] = 1 \text{ mg L}^{-1}$

- *Cefadroxilo*

Se estableció el caudal más alto que permitía el sistema sin llegar a producir sobrepresiones en el mismo, 1.3 mL min^{-1} .

En el estudio del tiempo de inserción ($10\text{-}100 \text{ s}$), tanto para la disolución de muestra como para la disolución de permanganato, se encontró que la señal analítica aumentaba hasta los 70 s y después permanecía constante. Por lo tanto, se seleccionó este valor para la inserción de ambas

disoluciones. En la *Figura II.36* se muestra la influencia del tiempo de inserción de muestra en la señal analítica. Es necesario tener en cuenta que, en el caso de la aplicación del sensor a la determinación de CFD en fármacos, es posible reducir sensiblemente el tiempo de inserción de muestra a fin de aumentar la frecuencia de muestreo, a pesar de la reducción de la sensibilidad del método que se produciría.

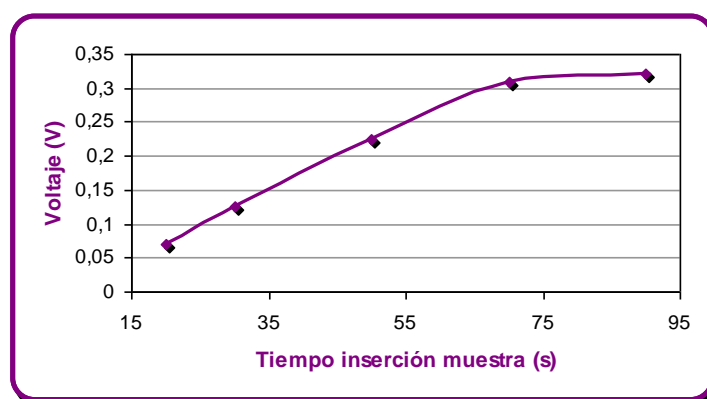


Figura II.36. Influencia del tiempo de inserción de muestra para la determinación de CFD. [CFD]= 30 μ M

- *Resveratrol y Piceido*

El tiempo óptimo de irradiación resultó ser de 20 y 25 s para *trans*-RVT y *trans*-PCD, respectivamente. Teniendo en cuenta la menor sensibilidad del método para la determinación de PCD, se eligió un valor de 25 s (*Figura II.37*). Como se comentó previamente, el tiempo de irradiación se establece variando la longitud del fotorreactor y el caudal. El volumen del fotorreactor puede ser calculado a partir de la siguiente expresión:

$$V = \pi r^2 l; \quad t = V/Q = \pi r^2 l/Q$$

donde:

V: volumen del fotorreactor (tubo de teflón enrollado en la lámpara, mL);

r: radio del tubo del fotorreactor (0.08 cm);

l: longitud del tubo del fotorreactor (cm);

t: tiempo de irradiación (s) y

Q: caudal (mL min^{-1})

Por tanto, se pueden establecer diferentes combinaciones de Q y l para obtener el tiempo de irradiación óptimo. En principio, se estableció el tiempo de irradiación seleccionado, 25 s, mediante

combinación del mayor caudal permitido por el sistema (1.1 mL min^{-1}) con un fotorreactor de 92 cm. Adicionalmente, se probaron fotorreactores de mayor y de menor longitud, aumentando y disminuyendo el flujo respectivamente. Se observó que caudales inferiores al seleccionado ocasionaban frecuencias de muestreo inferiores sin originar un aumento apreciable en la señal analítica. Caudales mayores originaban sobrepresiones en el sistema.

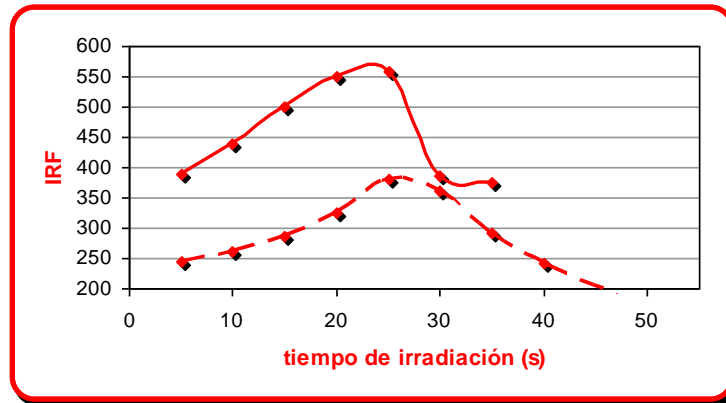


Figura II.37. Influencia del tiempo de irradiación para la determinación simultánea de RVT y PCD. Longitud del fotorreactor, 460 cm; tiempo de inserción, 125 s; $[trans-RVT]=1 \mu\text{g mL}^{-1}$ (línea continua); $[trans-PCD]=1 \mu\text{g mL}^{-1}$ (línea discontinua)

El estudio de tiempo de inserción de muestra se llevó a cabo en un rango comprendido entre 60 y 140 s. En ambos casos se observó un incremento en la señal analítica hasta 125 s, permaneciendo constante para tiempos superiores. Este valor fue el escogido como óptimo, el cuál se corresponde con un volumen de $2146 \mu\text{L}$ (Figura II.38).

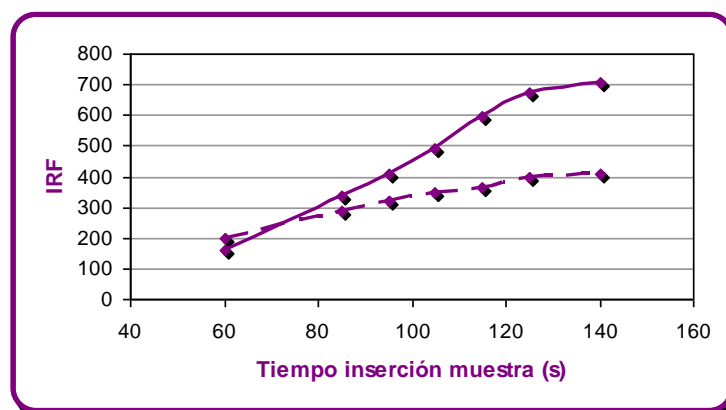


Figura II.38. Influencia del tiempo de inserción para la determinación simultánea de RVT y PCD. Longitud del fotorreactor, 92 cm; caudal, 1.1 mL min^{-1} ; $[trans-RVT]=1 \mu\text{g mL}^{-1}$ (línea continua); $[trans-PCD]=1 \mu\text{g mL}^{-1}$ (línea discontinua)

- *Bisfenol A*

Del estudio de la influencia del caudal, se seleccionó un valor óptimo de 1.7 mL min^{-1} . En lo que respecta al tiempo de inserción de muestra, éste fue estudiado en el intervalo de 10-120 s, observándose un aumento lineal de la señal analítica con el tiempo hasta un valor de 110 s (*Figura II.39*), que fue seleccionado para el desarrollo del sensor. Valores superiores a éste, además de no proporcionar un incremento significativo en la señal originaban una disminución en la frecuencia de muestreo.

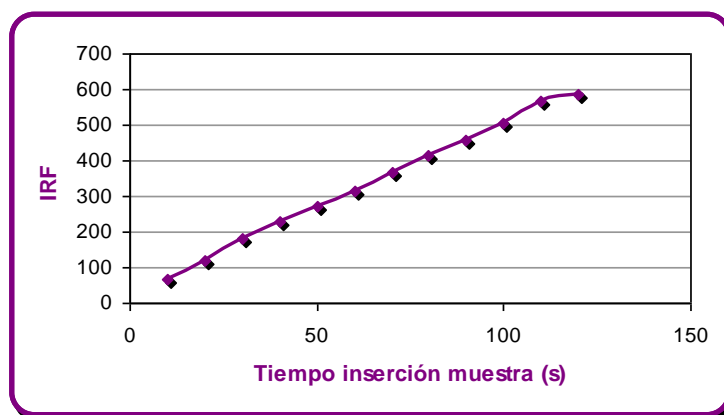


Figura II.39. Influencia del tiempo de inserción para la determinación de BPA. [BPA] = 4 ng mL^{-1} ; caudal, 1.7 mL min^{-1} .

A continuación se muestra una tabla que resume las variables del sistema de flujo optimizadas para cada uno de los ocho optosensores desarrollados en esta Memoria.

Tabla II.6. Resumen de las variables del sistema de flujo optimizadas para cada optosensor

Optosensor	Volumen/Tiempo de inserción de muestra	Tiempo de irradiación (s)	Longitud del fotorreactor (cm)	Caudal (mL min ⁻¹)
SCG	100-800 ^a	-	-	1.2
CFD	10-70 ^b	-	-	1.3
INM	100-1000 ^a	-	-	1.5
RVT	10-80 ^b	15	110	2.2
PCD	5-90 ^b	30	189	1.9
RVT/PCD	60-125 ^b	25	92	1.1
AFB ₁	10-60 ^b	120	400	2.0
BPA	10-110 ^b	-	-	1.7

^aintervalo lineal del volumen (μL)^bintervalo lineal del tiempo de inserción (s)

7. Calibración de los sensores. Parámetros analíticos

En todos los optosensores desarrollados en esta Memoria se ha empleado calibración univariante y se han ajustado los datos mediante regresión lineal por mínimos cuadrados. Para construir las funciones de calibrado de cada uno de los optosensores, siguiendo el procedimiento previamente propuesto se insertaron por triplicado en el sistema de flujo volúmenes iguales de disoluciones patrón de los analitos a niveles crecientes de concentración y se registraron las correspondientes señales analíticas. En todos los casos se utilizó la altura del pico correspondiente a la señal analítica.

En cada uno de los optosensores se determinaron los siguientes parámetros analíticos: *intervalo dinámico lineal*, *repetitividad*, *límites de detección* y *cuantificación* y *frecuencia de muestreo*. A continuación se describe el procedimiento utilizado para la determinación de cada uno de ellos.

✓ *Intervalo dinámico lineal*

Se puede definir como el intervalo en el cual la señal registrada es proporcional a la concentración mediante la ecuación de una línea recta ($y = ax + b$), donde y es la señal analítica, x es la concentración, a es la pendiente y b es la ordenada en el origen. El límite inferior del *intervalo dinámico lineal* coincide con el *límite de cuantificación*, mientras que el límite superior marca el valor máximo de concentración que puede introducirse en el sistema para poder ser relacionada con la señal que origina, siendo necesario diluir la muestra o inyectar una menor cantidad de la misma para valores superiores.

✓ *Repetitividad*

Con objeto de evaluar la repetitividad del método propuesto, se realizaron diez inserciones sucesivas en el sistema de flujo de disoluciones del analito con la misma concentración, midiendo su correspondiente señal analítica. Un análisis estadístico de los datos proporcionó la *desviación estándar relativa* (RSD).

✓ *Límite de detección y cuantificación*

Por el término *límite de detección* de una magnitud se entiende al valor mínimo de la misma que puede afirmarse que es distinto de cero. En nuestro caso la magnitud medida es la señal analítica Y . Denominaremos Y_L al *límite de detección* de esta magnitud, el cual corresponde a la incertidumbre sobre el valor de Y cuando ésta tiende a cero. Según el caso, Y_L es igual bien al límite

de sensibilidad del aparato de medida, bien a la incertidumbre sobre los errores sistemáticos, o bien, a la incertidumbre sobre la precisión de los resultados.

Cuando Y es igual a Y_L , es decir cuando el error absoluto sobre la medida se iguala a la magnitud a determinar, entonces el valor obtenido Y cumple:

$$0 \leq Y \leq Y_b + 3\sigma$$

donde:

Y_b : señal analítica media obtenida para el blanco

σ : desviación estándar para el blanco

Se admite como *límite de detección* el valor²²⁰:

$$Y_L = Y_b + 3\sigma$$

El *límite de detección* en términos de concentración, c_L , se obtendrá usando la función de calibrado:

$$c_L = (Y_L - Y_b)/m = 3\sigma/m$$

siendo m la pendiente de la recta de calibrado.

Conforme la señal analítica Y crece por encima del *límite de detección* crece la concentración aparente del analito. Como criterio mínimo, la región de cuantificación debe estar claramente por encima del límite de detección.

Por otro lado, se admite igualmente la siguiente definición²²¹:

$$Y_Q = Y_b + 10\sigma$$

donde:

Y_Q : señal analítica correspondiente al *límite de cuantificación*

Y_b : señal analítica obtenida para el blanco

²²⁰ IUPAC, Nomenclature, symbols, units and their usage in spectrochemical analysis II, Spectrochimica Acta B 33B (1978) 241-245.

²²¹ Guidelines for Data Acquisition and Data Quality Evaluation in Environmental Chemistry, Analytical Chemistry 52 (1980) 2242-2249.

σ : desviación estándar para el blanco

El *límite de cuantificación* en términos de concentración, c_Q , se obtendrá a partir de la función de calibrado:

$$c_Q = (Y_Q - Y_b) / m = 10\sigma / m$$

donde m es la pendiente de la recta de calibrado.

Para la determinación del *límite de detección y cuantificación* se insertó en el sistema diez veces sucesivas el blanco de cada sensor, es decir, la disolución acondicionadora de la muestra registrándose las correspondientes señales analíticas. Esto se llevó a cabo para cada uno de los volúmenes de muestra previamente seleccionados.

✓ Frecuencia de muestreo

La *frecuencia de muestreo* da una idea de la velocidad de análisis, indicando el número de muestras que se pueden analizar con los sensores propuestos en una hora. Las variables hidrodinámicas del sistema del flujo (caudal y volumen/tiempo de inserción) influyen en este parámetro, de forma que cuanto mayor sea el caudal y menor el volumen o tiempo de inserción de la muestra, mayor será la frecuencia de muestreo.

En las *Tablas II.7, II.8 y II.9* se resumen los parámetros analíticos obtenidos para los ocho optosensores desarrollados en esta Memoria.

Tabla II.7. Parámetros analíticos de los optosensores desarrollados para la determinación de principios activos

Parámetro	SGC		CFD	INM	
	150 μ L	800 μ L		100 μ L	1000 μ L
Rango dinámico lineal	0.2–4 mg/L	0.05–2 mg/L	2.7–110 μ M	5–150 ng/mL	0.5–6.5 ng/mL
Límite de cuantificación	0.2 mg/L	0.05 mg/L	2.7 μ M	5 ng/mL	0.5 ng/mL
Límite de detección	0.06 mg/L	0.015 mg/L	0.8 μ M	1.5 ng/mL	0.15 ng/mL
R.S.D. (%) (n= 10)	1.8 (1) ^a	1.6 (0.4) ^a	3.3 (55) ^b	2.1 (75) ^c	3.9 (3.5) ^c
Frecuencia muestreo/h ⁻¹	12	11	16	14	11

^a Nivel de concentración en mg/L

^b Nivel de concentración en μ M

^c Nivel de concentración en ng/mL

Tabla II.8. Parámetros analíticos de los optosensores desarrollados para la determinación de constituyentes naturales en alimentos y bebidas

Parámetro	RVT	PCD	RVT/PCD	
			RVT	PCD
Rango dinámico lineal	3.3–100 µg/L	15-120 µg/L	0.03–1 µg/mL	0.04-1 µg/mL
Límite de cuantificación	3.3 µg/L	3.5 µg/L	31 µg/L	42 µg/L
Límite de detección	1.0 µg/L	1.0 µg/L	9.3 µg/L	12.6 µg/L
R.S.D. (%) (n= 10)	1.8 (40) ^a	2.1 (50) ^a	4.1 (0.5) ^b	3.8 (0.5) ^b
Frecuencia de muestreo / h ⁻¹	12	20	5	5

^a Nivel de concentración en ng/mL^b Nivel de concentración en µg/mL**Tabla II.9.** Parámetros analíticos de los optosensores desarrollados para la determinación de contaminantes en alimentos y bebidas

Parámetro	AFB ₁	BPA
Rango dinámico lineal	0.09–12 µg/L	0.2–5.0 µg/L
Límite de cuantificación	0.09 µg/L	0.2 µg/L
Límite de detección	0.029 µg/L	0.06 µg/L
R.S.D. (%) (n= 10)	1.4 (5) ^a	3.4 (4) ^a
Frecuencia de muestreo / h ⁻¹	10	30

^a Nivel de concentración en µg/L

A continuación se muestran, a modo de ejemplo, las gráficas y funciones de calibración correspondientes a dos de los optosensores desarrollados en esta Memoria (*Figuras II.40 y II.41*).

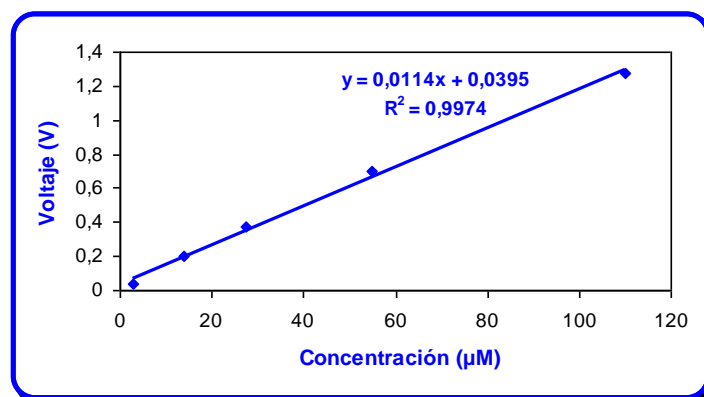


Figura II.40. Gráfica y función de calibración del sensor desarrollado para la determinación de CFD

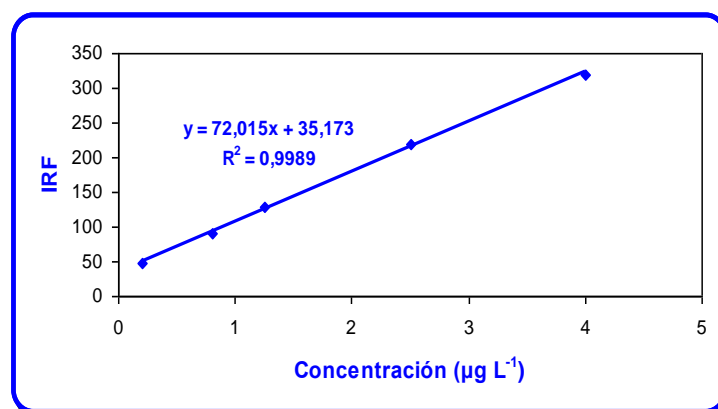


Figura II.41. Gráfica y función de calibración del sensor desarrollado para la determinación de BPA

8. Estudio del efecto de posibles especies interferentes

Una vez realizadas las experiencias necesarias para la optimización de las variables experimentales y la calibración de cada sensor, se pasó al estudio de la selectividad de los sensores para los analitos objetos de estudio.

Es necesario poner de manifiesto el hecho de que la presencia del soporte sólido en el área de detección ya supone un considerable aumento en la selectividad del sistema, debido a que el analito (o especie monitorizada) se retiene selectivamente sobre dicho soporte y queda separado de este modo del resto de la matriz. No obstante, es posible que sean retenidas también otras especies que posean un comportamiento muy similar al del analito frente al soporte sólido.

Por otra parte, también es posible afirmar que, en general, los optosensores que utilizan PIF o CL como método de detección presentan una mayor selectividad que aquellos en los que se mide la fluorescencia nativa u obtenida tras una derivatización química, debido al escaso grupo de sustancias que presentan estas propiedades. En PIF es a veces incluso posible la discriminación de sustancias pertenecientes a la misma familia de compuestos con una estructura química muy similar, siempre y cuando los grupos funcionales implicados en la reacción de fotodegradación difieran. Además, es necesario tener en cuenta que las condiciones óptimas para la fotodegradación de cada analito están muy bien definidas, pudiendo ser muy distintas respecto a otros compuestos de la misma familia en términos de naturaleza del fotoproducto, tiempo de irradiación, pH, etc.

Para el estudio en cuestión, se seleccionaron como posibles interferentes aquellas especies que más frecuentemente acompañan a los analitos en las muestras reales a las que se va a aplicar cada sensor desarrollado. A continuación se resumen los resultados obtenidos en cada estudio, discutiendo los resultados más relevantes obtenidos en cada caso.

8.1. Sensores para la determinación de principios activos

Puesto que los sensores aquí incluidos se utilizaron para la determinación de principios activos tanto en fármacos como en orina, se estudiaron como posibles interferentes especies orgánicas e inorgánicas que podían aparecer junto con el analito en estas muestras.

Para llevar a cabo este estudio, se analizaron disoluciones que contenían una cantidad constante del analito correspondiente y cantidades crecientes de la especie cuyo efecto se pretendía determinar. Comparando la señal analítica que producían estas disoluciones y la obtenida para una

disolución conteniendo sólo el analito, se determinó la tolerancia del sensor a cada una de estas especies.

Se consideró que una especie extraña no interfería si ésta producía un error menor de $\pm 2\sigma$ en la señal analítica, siendo σ la desviación estándar. La tolerancia se expresa en cada caso como la relación especie extraña/analito, en masa (m/m).

En el caso del SCG, se probaron excipientes que contenían los fármacos, tales como lactosa, sacarosa, glucosa y almidón y se obtuvo en todos los casos una tolerancia superior a 1000. Se ensayaron también especies orgánicas e inorgánicas de la orina, y se encontró que la tolerancia era también superior a 1000 para los iones Na^+ , K^+ , NH_4^+ , Cl^- , I^- y NO_3^- . En la *Tabla II.10* se muestra la tolerancia al resto de componentes de la orina ensayados.

Tabla II.10. Estudio de especies interferentes para SCG

Especies extrañas	Tolerancia (interferente/analito)
	(m/m) ^a
Urea, Mg^{2+} , PO_4^{3-} , SO_4^{2-}	500
CO_3^{2-}	100
Ca^{2+} , ácido úrico	90
Cu^{2+} , Fe^{3+}	3

^a Para una concentración de SCG de 400 ng mL⁻¹

En todos los casos, las concentraciones toleradas de especies extrañas eran mayores que las encontradas habitualmente en las muestras reales. Cu^{2+} y Fe^{3+} fueron las especies que tuvieron un mayor efecto interferente, sin embargo su concentración en orina está por debajo de la tolerada, lo cual hace posible la determinación de SCG en dicha matriz con el método propuesto. Se determinó también la tolerancia del método a la presencia de Cu^{2+} y Fe^{3+} en disolución homogénea (sin soporte sólido) y esta resultó ser 100 veces inferior. Por tanto, la determinación de SCG en orina en el modo convencional no sería posible sin la previa eliminación de estas especies interferentes.

En el sensor desarrollado para la determinación de CFD en fármacos y orina, se observó una alta tolerancia a la presencia de todas las especies interferentes estudiadas, lo que es consecuencia directa del uso de un soporte sólido y de la detección por CL (*Tabla II.11*). La menor tolerancia a la presencia del ión Fe^{3+} puede ser explicada por el carácter oxidante que presenta dicho catión que hace que interfiera en la reacción quimioluminiscente.

Tabla II.11. Estudio de especies interferentes para CFD

Especies extrañas	Tolerancia (interferente/analito) (m/m) ^a
Lactosa, sacarosa, glucosa, almidón	>500 ^b
Na ⁺ , K ⁺ , Cl ⁻ , I ⁻ , NO ₃ ⁻ , CO ₃ ²⁻ , PO ₄ ³⁻	>500 ^b
Urea, Mg ²⁺	400
Ácido úrico, Ca ²⁺ , Cu ²⁺	300
Fe ³⁺	16

^a Para una concentración de CFD de 30 µM^b Máxima relación ensayada

En general, los resultados obtenidos en el sensor de INM mostraron que el método propuesto es altamente selectivo en su aplicación al análisis de fármacos y orina (*Tabla II.12*). El estudio fue realizado empleando el volumen de muestra más bajo, 100 µL.

Tabla II.12. Estudio de especies interferentes para INM

Especies extrañas	Tolerancia (interferente/analito) (m/m) ^a
Lactosa, sacarosa, glucosa, almidón, Na ⁺ , K ⁺ , Cl ⁻ , I ⁻ , SO ₄ ²⁻ , ácido úrico, creatinina	>500 ^b
Ca ²⁺	350
NO ₃ ⁻	80
Urea	45
CO ₃ ²⁻	40
Mg ²⁺	30
PO ₄ ³⁻	20
Cu ²⁺	6
Fe ³⁺	3

^a Para una concentración de INM de 70 ng mL⁻¹^b Máxima relación ensayada

Los iones Cu^{2+} y Fe^{3+} fueron los interferentes más importantes. Sin embargo, los niveles de tolerancia son suficientes para la determinación INM en orina. Además, se comprobó que estos niveles pueden verse incrementados hasta veinte veces añadiendo a la disolución portadora una concentración de EDTA 2.68×10^{-4} M.

8.2. Sensores para la determinación de compuestos de interés en alimentos y bebidas

Dada la naturaleza de las muestras, en este caso la realización de un estudio de interferentes tal y como se llevó a cabo para fármacos y orina no fue posible. En todos los casos fue necesario un pretratamiento de la muestra con objeto de extraer el analito y eliminar posibles especies interferentes. En el caso concreto de los sensores desarrollados para la determinación de RVT o PCD, fue necesario incluir en ese pretratamiento la eliminación del PCD o RVT, respectivamente. Este aspecto será desarrollado en el apartado 9 de este Capítulo.

9. Aplicaciones analíticas

Para comprobar la aplicabilidad de los métodos propuestos, éstos fueron aplicados a la determinación de los diferentes analitos en muestras reales mediante los procedimientos ya descritos. Puesto que las muestras eran de naturaleza muy diversa requirieron un tratamiento distinto en cada caso, más o menos laborioso en función de la complejidad de la muestra. Algunos de los métodos de tratamiento de muestra fueron desarrollados por primera vez en esta Memoria y otros fueron modificados a partir de procedimientos previamente descritos en bibliografía.

Las muestras a las que fueron aplicadas cada sensor se muestran en la *Tabla II.13*.

Tabla II.13. Aplicaciones para cada sensor desarrollado

Optosensor	Muestra
SCG	Fármacos; Orina
CFD	Fármacos; Orina
INM	Fármacos; Orina
RVT	Cerveza
PCD	Cacao y productos derivados
RVT/PCD	Vino
AFB ₁	Cerveza
BPA	Leche

A continuación se discutirá la preparación de la muestra analizada, los resultados obtenidos en las aplicaciones y las particularidades más relevantes de cada optosensor.

9.1. Sensores para la determinación de principios activos

9.1.1. Preparación de muestra

✓ Fármacos

Todos los fármacos analizados se encontraban recogidos en la Farmacopea Española y poseían diversas formas de presentación: cápsulas, colirios, jarabes y soluciones.

Las cápsulas se molturaron (10 unidades), se homogeneizaron, se pesó una cantidad apropiada y se disolvió, siempre que fue posible, en agua desionizada. Sólo en el caso de cápsulas que contenían INM éstas fueron disueltas en MeOH:H₂O (60:40, v/v) y posteriormente filtradas a través de un filtro de membrana de 0.45 µm de diámetro de poro para eliminar las partículas insolubles. Finalmente, todas las disoluciones obtenidas fueron diluidas en el medio optimizado para la muestra: 0.1 M H₂SO₄ para CFD, 0.01 M NaOH para INM y agua desionizada para SCG.

Las soluciones, colirios y jarabes se disolvieron directamente en agua desionizada y, al igual que las cápsulas, se diluyeron en el medio correspondiente.

✓ Orina

Las muestras de orina se tomaron de voluntarios sanos. No se requiso en ninguno de los casos un pretratamiento de muestra complejo. En el caso de la determinación de SCG, las muestras (ya fortificadas) eran simplemente diluidas con agua desionizada; sólo en el caso de que se observara turbidez, eran previamente filtradas. En la determinación de CFD e INM, las muestras fueron fortificadas y se les añadió acetonitrilo (2 mL/4 mL orina). La mezcla se homogeneizó bien y se centrifugó posteriormente durante 10 ó 15 min. Se filtró luego a través de un filtro con diámetro de poro de 0.45 µm y, finalmente, al igual que para los fármacos, las disoluciones obtenidas fueron diluidas con el medio optimizado para la muestra.

9.1.2. Análisis de muestra

Cada una de las muestras fue analizada por triplicado siguiendo el procedimiento previamente descrito.

En la determinación de CFD, INM y SGC en fármacos se observó que los resultados obtenidos estaban en todos los casos en concordancia con los proporcionados por el fabricante. Se llevó a cabo

además un estudio de recuperación a tres niveles de concentración, obteniéndose porcentajes de recuperación comprendidos entre 94 y 104 % (Tabla II.14).

Tabla II.14. Aplicaciones analíticas en fármacos

Optosensor	Fármacos analizados	Concentración encontrada	Recuperación (%)
SCG	Cusicrom fuerte (<i>Ltd. Cusí</i>) ^a	42 mg/mL	97-104
	Frenal Compositum (<i>Ltd. Sigma-tau</i>) ^b	21 mg/cápsula	
	Cusicrom fuerte (<i>Ltd. Alcón</i>) ^c	39 mg/mL	
CFD	Duracef (<i>Ldt. Juste</i>) ^d	494 mg/cápsula	96-104
	Duracef (<i>Ldt. Juste</i>) ^e	235 mg/5 mL	
	Cefadroxilo Sabater (<i>Generfarma S.L.</i>) ^f	490 mg/cápsula	
INM	Inacid (<i>Ldt. Merck Sharp Dohme</i>) ^g	25 mg/cápsula	94-104
	Flogoter (<i>Ldt. Estedi</i>) ^h	26 mg/cápsula	
	Indonilo (<i>Ldt. Sigma TAU</i>) ⁱ	50 mg/cápsula	

Concentración del principio activo en el fármaco: ^a 40 mg/mL; ^b 20 mg/cápsula; ^c 40 mg/mL; ^d 500 mg/cápsula; ^e 250 mg/5 mL; ^f 500 mg/cápsula; ^g 25 mg/cápsula; ^h 25 mg/cápsula; ⁱ 50 mg/cápsula

En el caso de las muestras de orina, una vez comprobado que estaban exentas del analito, se llevó a cabo un estudio de recuperación a tres niveles distintos de concentración. Los porcentajes de recuperación estuvieron en el intervalo 96-107% para SCG, 95-102% para CFD y 97-107% para INM. En la *Tabla II.15* se muestran los resultados obtenidos en la determinación de SGC.

Tabla II.15. Determinación de SGC en orina

Muestra	Concentración añadida ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración encontrada ($\mu\text{g/mL}$)	Recuperación (%) \pm RSD ^a
Orina-1	1	1.02	102 \pm 2
	2	2.10	105 \pm 2
	4	3.90	98 \pm 1
Orina-2	0.5	0.52	104 \pm 3
	1	1.07	107 \pm 2
	2	1.94	97 \pm 2
Orina-3	5	5.15	103 \pm 1
	10	9.60	96 \pm 1
	12	12.50	104 \pm 2
Orina-4	3	2.90	97 \pm 1
	6	6.06	101 \pm 2
	8	7.80	98 \pm 1

^aMedia de tres determinaciones

9.2. Sensores para la determinación de compuestos de interés en alimentos y bebidas

9.2.1. Preparación de muestra

- *Resveratrol*

Las muestras de cerveza analizadas fueron adquiridas en establecimientos locales. Éstas se mantuvieron alejadas de la luz durante todo el proceso de análisis. Para la extracción del RVT de la cerveza se desarrolló un nuevo procedimiento mediante SPE, basado en uno previamente descrito en bibliografía¹⁵⁸ en el que se realizaron una serie de modificaciones.

Muchas de las especies orgánicas presentes en la matriz eran directamente excluidas del soporte sólido, ya que el fotoproducto fluorescente generado a partir del RVT era retenido en Sephadex QAE A-25. La naturaleza de este soporte, resina de intercambio aniónico, hace que sea bastante selectivo. Sin embargo, fue necesario eliminar otras especies que podían ser retenidas,

compitiendo así con el producto de fotodegradación por los sitios activos del soporte sólido. Se comprobó que la especie interferente más importante era el propio glicósido del RVT, el PCD, también presente en la cerveza¹⁷¹, ya que mostraba un comportamiento muy similar al del RVT. Bajo irradiación UV, el PCD también origina un fotoproducto fluorescente que se retiene sobre Sephadex QAE A-25 mostrando un completo solapamiento espectral con el fotoproducto del RVT. Se observó además que los ácidos cafeico y gálico interferían en la determinación de RVT cuando sus cantidades eran 5 y 80 (m/m) veces mayores que las de éste último, respectivamente. No obstante, no se observó interferencia para el caso de la catequina y la quercetina, igualmente presentes en cerveza.

La preparación de la muestra se llevó a cabo en dos etapas:

(1) *Eliminación de los compuestos hidrofóbicos.* De acuerdo con la bibliografía¹⁵⁸, para obtener un alto porcentaje de extracción de polifenoles en cerveza es necesaria la previa eliminación de lípidos (delipidación) y resinas del lúpulo, lo que suele llevarse a cabo utilizando éter etílico. Sin embargo, la solubilidad apreciable del RVT en dicho disolvente hizo imposible su utilización en este caso para tal fin. Por ello, la eliminación de tales compuestos hidrofóbicos se llevó a cabo con tolueno y ciclohexano. En primer lugar, alícuotas de 25 mL de cerveza fueron desgasificadas y fortificadas con cantidades conocidas de *trans*-RVT. Posteriormente se trataron con 25 mL de tolueno (tres veces) y 25 mL de ciclohexano (tres veces). Tras cada extracción, la mezcla era centrifugada durante 5 min a 4200 g y se eliminaba el sobrenadante. Finalmente, la cerveza ya limpia se secó bajo vacío (30 °C) con el fin de eliminar los restos de disolvente.

(2) *Extracción de RVT mediante SPE.* El objetivo de esta etapa era realizar una extracción selectiva del RVT de la cerveza. Se probó, en primer lugar, a realizar una extracción líquido-líquido con los disolventes que se utilizan usualmente para la extracción de RVT y PCD desde muestras líquidas, éter etílico y acetato de etilo. Se comprobó que el éter etílico proporcionaba una recuperación de RVT del 80%, pero que el PCD también era significativamente extraído (5%). El uso de un disolvente más polar como el acetato de etilo proporcionaba un porcentaje de extracción para el PCD aún mayor (10%). Por lo tanto, la extracción líquido-líquido se descartó y se optó por una SPE, haciendo uso de cartuchos de C₁₈.

Los cartuchos de C₁₈ fueron acondicionados, en un primer paso, pasando consecutivamente 3 mL de MeOH y 6 mL de H₂O. Después, la cerveza se pasó a través del cartucho a un flujo de 3-4 mL min⁻¹, bajo vacío. Posteriormente, con el propósito de llevar a cabo las etapas de lavado y elución, se probaron diferentes disolventes: H₂O, acetato de etilo, éter etílico y MeOH. Para este estudio, todos los eluatos obtenidos se monitorizaron desde 250 a 425 nm con un espectrofotómetro UV-visible. Una

primera etapa de lavado con agua permitió la eliminación de los compuestos más polares de la matriz. El volumen de agua necesario se estudió en el rango de 2 a 8 mL y se encontró que 6 mL era el óptimo. En una segunda etapa de lavado, a fin de eliminar el PCD y otros posibles interferentes de polaridad similar sin extraer el RVT, se ensayaron disoluciones con distintos porcentajes de MeOH (20, 35, 40 y 50 % (v/v)). Los resultados obtenidos se muestran en la *Tabla II.16*.

Tabla II.16. Porcentajes de recuperación de *trans*-RVT y *trans*-PCD en función del disolvente

Disolvente	Porcentaje de recuperación (%)	
	<i>trans</i> -RVT	<i>trans</i> -PCD
MeOH:H ₂ O (20:80, v/v)	0	0
MeOH:H ₂ O (35:65, v/v)	0	35
MeOH:H ₂ O (40:60, v/v)	0	81
MeOH:H ₂ O (50:50, v/v)	10	80
MeOH:H ₂ O (80:20, v/v)	75	81
MeOH	82	83

Tras los resultados obtenidos, mostrados en la tabla anterior, se escogió como óptima una disolución de MeOH:H₂O al 40% (v/v), siendo 6 mL el volumen óptimo necesario para el lavado. Finalmente, para la elución de RVT se probó con éter etílico, acetato de etilo y MeOH (80 y 100% (v/v)), siendo seleccionado como eluyente MeOH puro ya que era el disolvente que proporcionaba el mejor porcentaje de recuperación (82%). La elución se llevó a cabo con 3 x 2 mL de MeOH y el eluato se concentró hasta sequedad bajo una suave corriente de nitrógeno. El residuo final se solubilizó en 10 mL de una disolución tampón 0.01 mol L⁻¹ de NaAc/HAc (pH 6.0).

- *Piceido*

El método propuesto fue aplicado a la determinación de *trans*-PCD en cacao en polvo, chocolate negro y chocolate con leche. Las muestras analizadas fueron adquiridas en mercados locales, se almacenaron a 4 °C y se mantuvieron al abrigo de la luz durante todo el proceso de análisis. Para la extracción del PCD se desarrolló un nuevo procedimiento de extracción a partir de un procedimiento descrito anteriormente para la extracción de estilbenos en lúpulo¹⁵⁸.

Generalmente se emplean procedimientos de “*clean-up*” para limpiar los extractos de polifenoles antes de su análisis por HPLC²²². En nuestro caso, los extractos de estilbenos tuvieron que ser también purificados con el objetivo de eliminar la aglicona del PCD (el RVT), el cual está presente también en el cacao y el chocolate^{183,184}. Tal y como hemos comentado anteriormente, en las condiciones de trabajo el RVT se convertía en un fotoproducto fluorescente, que era también retenido sobre el soporte sólido (Sephadex QAE A-25), compitiendo de esta forma con el fotoproducto fluorescente del PCD.

La preparación de la muestra se llevó a cabo en tres etapas:

(1) *Eliminación de los compuestos hidrofóbicos*. Primeramente se llevó a cabo una etapa previa de delipidación con tolueno y ciclohexano para mejorar la posterior extracción de PCD, siendo necesario reducir previamente el chocolate a polvo. Las muestras de chocolate (1 g en el caso de cacao en polvo y chocolate negro, y 2 g en el caso de chocolate con leche) se fortificaron con cantidades apropiadas de *trans*-PCD. Seguidamente, se trataron con 5 mL de tolueno (tres veces) y 5 mL de ciclohexano (tres veces), siendo cada vez agitadas (3 min) y centrifugadas durante 5 min a 4200 g. Finalmente se eliminó el sobrenadante y la muestra delipidada se secó bajo vacío (30 °C) con el fin de eliminar los restos de disolvente.

(2) *Extracción del PCD*. Las muestras delipidadas se sometieron a extracción tres veces con 4 mL de una disolución de EtOH:H₂O (80:20, v/v), agitando suavemente durante 5 min en cada etapa. Al final de cada extracción las muestras se centrifugaron durante 5 min a 4200 g, se unieron los distintos sobrenadantes, y se secaron bajo vacío (30 °C) para eliminar cualquier residuo de disolvente. De esta forma se consiguió extraer el PCD, junto con el RVT.

(3) *Clean-up del extracto mediante SPE*. La finalidad de esta etapa era fundamentalmente separar el PCD del RVT, cuya interferencia ya se ha comentado, y eliminar a la vez otros componentes de la matriz. Se llevó a cabo utilizando cartuchos de gel de sílice C₁₈, que fueron, en un primer paso, acondicionados pasando consecutivamente 3 mL de MeOH y 6 mL de H₂O. Después, el extracto obtenido en la etapa anterior se pasó a través del cartucho a un flujo de 3-4 mL min⁻¹ bajo vacío. Posteriormente, se ensayaron diferentes disolventes para llevar a cabo tanto la etapa de lavado como la de elución: agua, MeOH, EtOH, éter etílico y acetato de etilo. Las eluatos recogidos fueron monitorizadas desde 250 a 425 nm con un espectrofotómetro UV-visible. Una primera etapa de lavado

²²² J. Wollgast, E. Anklam, Food Research International 33 (2000) 423-447.

con H₂O permitió la eliminación de los compuestos más polares de la matriz, como los azúcares. Se estudió el volumen de necesario en un rango de 2 a 10 mL, resultando ser 6 mL el volumen óptimo. La elución del PCD sin eluir el RVT solamente fue posible usando disoluciones de MeOH con porcentajes comprendidos entre 20 y 50% (v/v). Una disolución de MeOH al 40% permitió la elución de un 90% de PCD. En dichas condiciones el RVT permanecía retenido sobre las partículas de C₁₈ (Figura II.42).

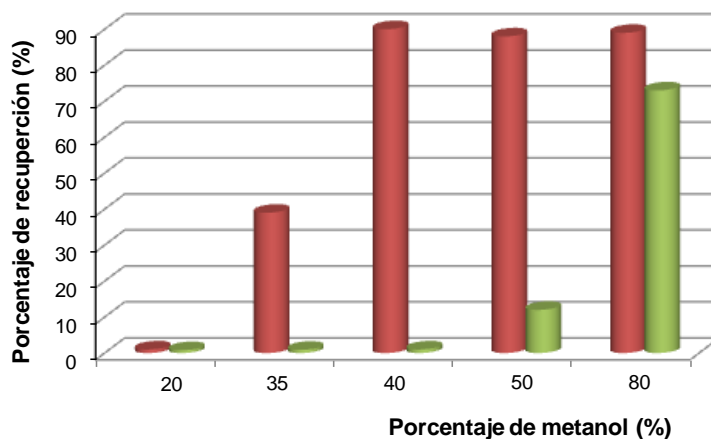


Figura II.42. Porcentajes de recuperación en SPE para PCD (rojo) y RVT (verde) en función del disolvente de elución (MeOH:H₂O, v/v)

El resto de disolventes probados no permitían la elución secuencial del PCD y RVT. Finalmente, la elución del PCD se llevó a cabo con 3 x 2 mL de una disolución de 40% (v/v) de MeOH. El eluato se sometió luego a evaporación bajo una corriente de nitrógeno y el residuo final se solubilizó en 10 mL de una disolución tampón 0.02 mol L⁻¹ de NaAc/HAc (pH 5.5).

- *Resveratrol y Piceido*

Se analizaron muestras de vino tinto y vino blanco que fueron adquiridas en mercados locales. Éstas se almacenaron a 4° C y se mantuvieron protegidas de la luz durante todo el proceso de análisis. La complejidad de la matriz del vino normalmente hace necesario llevar a cabo un tratamiento de la muestra antes del análisis de RVT y PCD. Efectivamente, se observó la existencia de un importante efecto matriz y se optó por una SPE para la extracción de RVT y PCD y eliminación de posibles interferentes. Esta técnica fue la elegida ya que en los sensores previamente desarrollados para la determinación individual de ambos analitos había proporcionado buenos porcentajes de recuperación. El nuevo método de tratamiento de muestra se desarrolló pues a partir de los desarrollados para la determinaciones individuales.

El procedimiento de SPE se llevó a cabo utilizando cartuchos de gel de sílice C₁₈, que fueron, en un primer paso, acondicionados pasando consecutivamente 3 mL de MeOH y 6 mL de H₂O. Se pasaron luego a través del cartucho 10 mL de la muestra de vino, a un flujo de 3-4 mL min⁻¹ y, a continuación, se realizó un lavado con H₂O que permitió la eliminación de los compuestos más polares de la matriz, como es el caso de los azúcares. Se estudió el volumen necesario en un rango de 1 a 10 mL, resultando ser 6 mL el volumen óptimo, comprobándose que no se producía ninguna pérdida de los analitos. Al igual que en la extracción individual de PCD y RVT, se eligió MeOH como disolvente de elución ya que era el que proporcionaba mejores recuperaciones para ambos analitos (85% para RVT; 88% para PCD) y, además, no existía interferencia de otros componentes de la matriz en el análisis de los extractos obtenidos. La etapa de elución se llevó a cabo con 3 x 2 mL de MeOH y el eluato se evaporó hasta sequedad bajo una ligera corriente de nitrógeno, a temperatura ambiente. No se observó ningún tipo de degradación de los analitos en esta etapa. El residuo final se solubilizó en 10 mL de una disolución tampón 0.04 mol L⁻¹ de NaAc/HAc (pH 5.5).

Se comprobó que tras este tratamiento de muestra se eliminaba completamente el efecto matriz.

- *Aflatoxina B₁*

Se analizaron muestras de cerveza que fueron adquiridas en mercados locales. Se almacenaron a 4° C y se preservaron de la luz durante todo el procedimiento de análisis. Dado que algunas micotoxinas encontradas en cereales, tales como la ocratoxina A, aflatoxinas (B₂, G₁, G₂, etc.), fumonisinas y tricotecenos (toxinas deoxinivalenol, T-2 y HT-2) pueden sobrevivir al proceso de la elaboración de la cerveza, al igual que la AFB₁, éstas pueden detectarse igualmente en dicha matriz²²³. Por lo tanto, fue necesario un pretratamiento de las muestras de cerveza para extraer la AFB₁ y asegurar la eliminación de otras especies que pudieran interferir en su determinación. Para ello, se desarrolló un nuevo método basado en SPE. Se eligió esta técnica ya que es la habitualmente utilizada tanto para la extracción directa de micotoxinas desde muestras líquidas como para el “*clean-up*” de éstas, debido a los buenos resultados que ofrece. Al igual que en el caso de la determinación de RVT en cerveza, previamente descrita, para la obtención de un alto porcentaje de extracción de la AFB₁ fue necesaria la eliminación previa de algunos compuestos de alto peso molecular del lúpulo (resinas), lo que se llevó a cabo con el método antes optimizado para el análisis de dicho estilbeno, al que se introdujeron varias modificaciones.

²²³ R. Romero-González, J.L.M. Vidal, M.M. Aguilera-Luiz, A.G. Frenich, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57 (2009) 9385-9392.

La preparación de la muestra se llevó a cabo en dos etapas:

(1) *Eliminación de los compuestos hidrofóbicos.* En primer lugar, alícuotas de 1 mL de cerveza fueron desgasificadas y fortificadas con cantidades conocidas de AFB₁. Posteriormente se trataron con 1 mL de tolueno (dos veces) y 1 mL de ciclohexano (dos veces), siendo cada vez agitadas y centrifugadas durante 5 min a 3500 rpm, eliminando al final de cada extracción el sobrenadante. Finalmente, la muestra de cerveza se secó bajo una corriente de nitrógeno con el fin de eliminar los restos de disolvente.

(2) *Extracción de la AFB₁ mediante SPE.* Se utilizaron cartuchos de C₁₈ debido a que éstos presentaban mayor afinidad por las aflatoxinas que por otras micotoxinas. Los cartuchos se acondicionaron pasando consecutivamente 10 mL de acetonitrilo y 10 mL de H₂O. Seguidamente, la muestra de cerveza se adicionó sobre los cartuchos, a un flujo de 2-3 mL min⁻¹ bajo vacío, y se procedió a optimizar las etapas de lavado y elución del analito. Los disolventes empleados así como los volúmenes correspondientes se seleccionaron teniendo en cuenta dos aspectos: la eliminación de la mayoría de las sustancias interferentes polares, sin eluir la AFB₁ (lavado), y una completa extracción de ésta última (elución). Se utilizaron 10 mL de H₂O y 2 mL de acetonitrilo, respectivamente. Las fumonisinas B₁ y B₂ eran eliminadas en la etapa de lavado debido a su alta solubilidad en agua. Después del lavado los cartuchos fueron secados a vacío durante 1 min. Para la elución de la AFB₁ se utilizó acetonitrilo ya que había demostrado su alta selectividad por las aflatoxinas (B₁, B₂, G₁ y G₂). Debido a la gran disminución que se producía en la señal de fluorescencia de la AFB₁ y su fotoproducto cuando el medio era acetonitrilo, fue necesario eliminar este último y sustituirlo por MeOH. Se estudió el porcentaje de MeOH necesario para tal fin en un rango de 0-30% (v/v) y se seleccionó como óptimo un 5% (v/v), la mínima cantidad posible para disolver el analito. Para disoluciones con un porcentaje de MeOH mayor al 10%, la señal de fluorescencia disminuía. Por lo tanto, el eluato fue evaporado hasta sequedad bajo una corriente de nitrógeno y el residuo se redisolvió en 10 mL de una disolución metanólica al 5% (v/v), a la que se ajustó el pH a 5.5 por adición de NaOH o HNO₃.

▪ *Bisfenol A*

Se analizaron muestras de leche, disponibles comercialmente en mercados locales, con diferente presentación: leche líquida, leche en polvo y fórmulas infantiles. Las muestras se mantuvieron alejadas de la luz a 4° C durante todo el proceso de análisis.

La preparación de la muestra se llevó a cabo en dos etapas:

(1) *Desproteneización*. Con el objetivo de extraer el BPA y recuperar altas cantidades del mismo, fue necesario llevar a cabo una previa eliminación de las proteínas. Ésta etapa se llevó a cabo tomando como referencia un procedimiento previamente descrito en bibliografía²²⁴, donde se precipitaban las proteínas con una disolución de ácido tricloroacético (TCA) al 2.5% (v/v) y el precipitado se lavaba con MeOH para evitar la adsorción del BPA en el mismo.

20 mL de leche en el caso de las muestras líquidas o 1 g disuelto en 10 mL de H₂O, en el caso de las muestras en polvo, fueron fortificados con una cantidad apropiada de BPA y desproteneizados. Finalmente, después de ser agitadas durante 30 s, las muestras se centrifugaron durante 3 min a 4200 g y se utilizó el sobrenadante para la posterior extracción.

(2) *Extracción del BPA* mediante SPE. En un primer paso los cartuchos de C₁₈ se acondicionaron pasando consecutivamente 5 mL de MeOH y 5 mL de H₂O. Después, las muestras de leche pretratadas, se adicionaron sobre los cartuchos a un flujo de 3-4 mL min⁻¹ y a vacío.

En segundo lugar se procedió a las etapas de lavado y elución del analito. Para ello se optimizaron los disolventes necesarios así como los volúmenes correspondientes. Se probaron disoluciones con diferentes porcentajes de MeOH (v/v) monitorizando las fracciones con un espectrofotómetro UV-visible recogidas desde 250 a 425 nm. Para la eliminación de las especies polares más potentes, en la etapa de lavado, se estudiaron disoluciones con los siguientes porcentajes de MeOH: 10, 20, 30, 40 y 50% (v/v). Como resultado óptimo se escogió 2 mL de una disolución de MeOH al 30% (v/v) ya que proporcionaba una buena eliminación de otras especies de la matriz sin eluir el analito. Tras esta etapa se procedió a secar los cartuchos a vacío durante 1 min. Para la elución de BPA se experimentó con disoluciones con porcentajes de MeOH comprendidos entre 70 y 100% (v/v). Se seleccionó un volumen de 3 mL de una disolución de MeOH al 80% (v/v), puesto que proporcionaba recuperaciones del analito comprendidas entre 90 y 100%. Finalmente, el eluato se sometió a evaporación bajo una corriente de nitrógeno y el residuo final se redisolvió en 10 mL de una disolución tampón 0.08 mol L⁻¹ de NaAc/HAc (pH 6.0).

9.2.2. Análisis de muestra

Para comprobar la aplicabilidad de los métodos propuestos en esta Memoria, éstos fueron aplicados a la determinación de los correspondientes analitos en muestras reales mediante los procedimientos previamente descritos. Los resultados obtenidos se compararon con los

²²⁴ I. Yi, J. Yin, Z. Xu, C. Zhao, H. Huang, H. Zhang, C. Wang, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 395 (2009) 1125-1133.

proporcionados por un método de referencia. Además, se realizaron estudios de recuperación a distintos niveles de concentración. Todas las medidas fueron realizadas por triplicado.

- *Resveratrol*

Cuando el método propuesto fue aplicado a la determinación de RVT en cervezas, tanto de baja como alta fermentación, se encontró un importante efecto matriz que no era eliminado en el tratamiento de muestra anteriormente descrito. Por tanto, fue necesario llevar a cabo una calibración por adición de patrón. La pendiente de la curva de calibrado obtenida tras la fortificación de los extractos finales con RVT era diferente de aquella obtenida cuando se fortificaban las muestras de cerveza. Además, ambas pendientes eran diferentes de la obtenida por calibración externa. Por lo tanto, el efecto matriz detectado era debido tanto a la presencia de especies interferentes en el extracto final como a una incompleta recuperación del RVT tras el pretratamiento. Por ello, el análisis de cada muestra se realizó fortificando, antes de realizar el tratamiento de muestra, diferentes alícuotas de aquella con cantidades crecientes de *trans*-RVT. El efecto matriz fue determinado comparando las pendientes obtenidas por calibración externa y calibración por adición de patrón, para las diferentes muestras de cerveza analizadas:

$$m_{c. \text{ externa}}/m_{c. \text{ adición patrón}} \approx 1.1$$

Los resultados obtenidos en el análisis de las muestras fueron comparados en cada caso con los encontrados por un método de referencia basado en HPLC-MS/MS¹⁷¹, el único método descrito hasta la fecha en bibliografía para la determinación de RVT en cerveza (*Tabla II.17*). Como puede observarse, las concentraciones de RVT en las muestras analizadas eran en todos los casos inferiores al límite de detección o cuantificación del método de referencia.

Las concentraciones de RVT encontradas por el método propuesto se encontraban en el rango 4.1 a 14 ng mL⁻¹. Dado que el contenido en RVT en tres de las muestras analizadas fue más bajo que el límite de cuantificación del método propuesto, se llevó a cabo un estudio de recuperación a dos niveles de concentración distinta (20-80 ng mL⁻¹). En todos los casos se obtuvieron buenos porcentajes de recuperación, estando el rango comprendido entre 99.5 y 101.5%. Además, los resultados obtenidos estuvieron en todos los casos en buena concordancia con los encontrados por el método de referencia.

Tabla II.17. Determinación de RVT en cerveza

	Concentración encontrada $\pm \sigma^a$	
	Método propuesto	Método de referencia ^b
Cervezas de alta fermentación		
Ale 1	6.2 \pm 0.5 ng mL ⁻¹	< LOQ
Ale 2	< LOD	< LOD
Bitter	20.3 \pm 0.5 ng mL ⁻¹	20.8 \pm 0.6 ng mL ⁻¹
	40.6 \pm 0.7 ng mL ⁻¹	41.0 \pm 1.2 ng mL ⁻¹
	< LOD	< LOD
Stout	60.5 \pm 1.1 ng mL ⁻¹	59.6 \pm 1.3 ng mL ⁻¹
	80.8 \pm 1.3 ng mL ⁻¹	79.2 \pm 1.4 ng mL ⁻¹
	6.3 \pm 0.3 ng mL ⁻¹	< LOQ
Cervezas de baja fermentación		
Lager 1	< LOD	< LOD
	19.9 \pm 0.5 ng mL ⁻¹	19.5 \pm 0.5 ng mL ⁻¹
	40.3 \pm 1.0 ng mL ⁻¹	39.8 \pm 0.7 ng mL ⁻¹
Lager 2	4.1 \pm 0.2 ng mL ⁻¹	< LOD
Pilsen 1	14.1 \pm 0.5 ng mL ⁻¹	< LOQ
Pilsen 2	12.2 \pm 0.5 ng mL ⁻¹	< LOQ

LOD: límite de detección; LOQ: límite de cuantificación; ^a Desviación estándar (n=3);

^b Referencia [171].

- *Piceido*

A pesar del previo tratamiento de muestra, también en este caso fue encontrado efecto matriz en la aplicación del método propuesto a las diferentes muestras a analizar, cacao en polvo y chocolate negro y con leche. Por ello, las curvas de calibración se construyeron en cada caso fortificando las muestras con cantidades crecientes de *trans*-PCD. Las curvas de calibración correspondientes se muestran en la *Tabla II.18*.

Tabla II.18. Parámetros analíticos para la determinación de PCD en muestras reales

Parámetro	PCD		
	Cacao en polvo	Chocolate negro	Chocolate con leche
Rango dinámico lineal (mg kg ⁻¹)	1.4 – 50	1.1 – 25	0.09 – 20
Curva de calibrado			
Ordenada en el origen ± σ^a	44.8 ± 0.5	44.5 ± 0.3	42.6 ± 0.6
Pendiente ± σ^a (kg mg ⁻¹)	8.0 ± 0.2	14.5 ± 0.4	124 ± 1
Coefficiente de correlación	0.9993	0.9996	0.9996
Límite de cuantificación (mg kg ⁻¹)	1.4	1.1	0.09
Límite de detección (mg kg ⁻¹)	0.4	0.3	0.03

^aDesviación estándar (n= 3)

Los resultados obtenidos en el análisis de muestras reales (*Tabla II.19*) fueron comparados con los proporcionados por un método cromatográfico de referencia²²⁵, y en todos los casos hubo una buena concordancia entre ambos. También se llevó a cabo un estudio de recuperación sobre las muestras analizadas, a tres niveles de concentración diferentes, obteniéndose buenos porcentajes de recuperación en todos los casos.

Como puede observarse y como era de esperar, el cacao en polvo contiene los mayores niveles de *trans*-PCD, seguido del chocolate negro y el chocolate con leche. Este mismo patrón se observó en un estudio previo de productos que contienen cacao²²⁶. Por otra parte, de los resultados obtenidos por el método de referencia, se pudo establecer que, tal y como fue descrito previamente, en cacao y chocolate sólo está presente el isómero *trans* del PCD^{225,226}.

²²⁵ C. Counet, D. Callemien, S. Collin, *Food Chemistry* 98 (2006) 649-657.

²²⁶ W.J. Hurst, J.A. Glinski, K.B. Miller, J. Apgar, M.H. Davey, D.A. Stuart, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56 (2008) 8374-8378.

Tabla II.19. Determinación de PCD en cacao y productos derivados

	Método propuesto		Método de referencia ^b
	Añadido (mg kg ⁻¹)	Encontrado ± σ^a (mg kg ⁻¹)	Encontrado ± σ^a (mg kg ⁻¹)
Cacao en polvo	-	5.6 ± 0.5	5.9 ± 0.2
	10	15.7 ± 0.9	16.1 ± 0.5
	20	25.3 ± 0.5	26.0 ± 1.1
	40	46.1 ± 0.4	45.6 ± 0.7
Chocolate negro	-	3.0 ± 0.4	2.8 ± 0.4
	10	13.5 ± 0.2	12.5 ± 0.6
	15	18.3 ± 0.3	17.6 ± 1.2
	20	23.5 ± 1.0	23.0 ± 0.8
Chocolate con leche	-	0.7 ± 0.3	0.8 ± 0.6
	0.8	1.5 ± 1.3	1.4 ± 0.2
	1.2	2.0 ± 0.3	1.9 ± 1.1
	1.8	2.4 ± 0.5	2.7 ± 0.9

^a Desviación estándar (n=3); ^b Referencia [225]

▪ *Resveratrol y Piceido*

En la determinación simultánea de RVT y PCD en vino blanco y tinto no se detectó efecto matriz, por lo que el análisis fue llevado a cabo por calibración externa. Los resultados obtenidos mediante el método propuesto (*Tabla II.20*) fueron comparados con aquellos encontrados con un método de referencia²²⁷. Además se llevó a cabo un estudio de recuperación fortificando las muestras con dos concentraciones diferentes de *trans*-RVT y *trans*-PCD. Los porcentajes de recuperación obtenidos fueron en todos los casos próximos al 100%. Como puede observarse en la *Tabla II.20*, en todos los casos la concentración de PCD encontrada, tanto en vino tinto como en vino blanco, era mayor que la de RVT. Por otro lado, las cantidades de ambos estilbenos en vino blanco eran más bajas que aquellas encontradas en vino tinto.

²²⁷ L. Camont, C.H. Cottart, Y. Rhayem, V. Nivet-Antoine, R. Djelidi, F. Collin, J.L. Beaudoux, D. Bonnefont-Rousselot, *Analytica Chimica Acta* 634 (2009) 121-128.

Tabla II.20. Determinación simultánea de RVT y PCD en vinos

	Método propuesto				Método de referencia ^b	
	Añadido ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		Encontrado $\pm \sigma^a$ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		Encontrado $\pm \sigma^a$ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	
	RVT	PCD	RVT	PCD	RVT	PCD
Vino tinto 1	-	-	0.22 ± 0.03	0.66 ± 0.04	0.23 ± 0.10	0.68 ± 0.02
	0.25	0.25	0.46 ± 0.01	0.95 ± 0.03	-	-
	0.50	0.50	0.71 ± 0.05	1.13 ± 0.05	-	-
Vino tinto 2	-	-	0.43 ± 0.05	0.81 ± 0.07	0.41 ± 0.05	0.84 ± 0.07
	0.25	0.25	0.69 ± 0.05	1.03 ± 0.05	-	-
	0.50	0.50	0.93 ± 0.06	1.35 ± 0.07	-	-
Vino blanco 1	-	-	0.09 ± 0.07	0.24 ± 0.04	0.09 ± 0.13	0.23 ± 0.06
	0.10	0.10	0.19 ± 0.04	0.35 ± 0.03	-	-
	0.30	0.30	0.38 ± 0.05	0.52 ± 0.10	-	-
Vino blanco 2	-	-	0.10 ± 0.12	0.18 ± 0.07	0.09 ± 0.07	0.20 ± 0.06
	0.10	0.10	0.19 ± 0.06	0.30 ± 0.05	-	-
	0.30	0.30	0.41 ± 0.08	0.46 ± 0.10	-	-

^a Desviación estándar (n=3); ^b Referencia [227]

- *Aflatoxina B₁*

La pendiente de la curva de calibrado obtenida tras la fortificación de los extractos finales con AFB₁ era diferente de la obtenida cuando se fortificaban inicialmente las muestras de cerveza. Además, ambas pendientes eran diferentes de la obtenida por calibración externa. En consecuencia se deduce que el efecto matriz detectado era debido tanto a la presencia de especies interferentes en el extracto final como a una incompleta recuperación de la aflatoxina tras el pretratamiento. Por ello, el análisis de cada muestra se realizó fortificando, antes de realizar el tratamiento de muestra, diferentes alícuotas de aquella con cantidades crecientes de AFB₁. El efecto matriz se evaluó comparando las pendientes obtenidas por calibración externa y calibración por adición de patrón, para las diferentes muestras de cerveza analizadas:

$$m_{c. \text{ externa}}/m_{c. \text{ adición patrón}} \approx 0.9$$

Se analizaron diecisiete muestras de cerveza, de las que cinco eran sin alcohol. De todas ellas, sólo se encontró AFB₁ en tres muestras de cerveza con alcohol (*Tabla II.21*). El método de referencia utilizado en este caso estaba basado en HPLC-MS/MS²²³. Se llevó a cabo además la comparación de la precisión y exactitud de ambos métodos haciendo uso de parámetros estadísticos: distribución *F* y distribución de la *t* de Student, respectivamente²²⁸. Los resultados mostraron en todos los casos que no existía diferencia estadística significativa entre ambos métodos.

Por otra parte, se llevó a cabo un estudio de recuperación a tres niveles de concentración en las tres muestras en las que se había encontrado AFB₁ y en dos muestras en las que no se detectó (*Tabla II.21*). Los porcentajes de recuperación encontrados estaban en el rango 94-106%.

²²⁸ L. Saunders and R. Fleming, *Mathematics and Statistics*. 2nd ed. London: Pharmaceutical Press (1971).

Tabla II.21. Determinación de AFB₁ en cerveza

	Método propuesto		Metodo de referencia ^b		t_{calc}^c	F_{calc}^d
	Añadido ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Encontrado $\pm \sigma^a$ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Encontrado $\pm \sigma^a$ ($\mu\text{g L}^{-1}$)			
Cerveza 1	-	0.86 \pm 0.05	0.90 \pm 0.02		1.28	6.25
	1	1.90 \pm 0.09	1.95 \pm 0.05		0.87	3.24
	2	2.83 \pm 0.03	2.86 \pm 0.10		1.66	0.10
	4	4.84 \pm 0.04	4.96 \pm 0.04		2.12	0.21
Cerveza 2	-	0.28 \pm 0.03	0.29 \pm 0.08		0.20	0.14
	2	2.33 \pm 0.05	2.25 \pm 0.06		1.77	0.70
	4	4.24 \pm 0.09	4.30 \pm 0.02		1.22	20.25
	6	6.30 \pm 0.06	6.36 \pm 0.08		1.04	0.56
Cerveza 3	-	0.17 \pm 0.07	0.15 \pm 0.06		0.37	1.36
	6	6.22 \pm 0.05	6.19 \pm 0.02		0.96	6.25
	8	8.28 \pm 0.08	8.17 \pm 0.09		1.15	0.79
	10	9.95 \pm 0.02	10.13 \pm 0.03		2.16	1.96
Cerveza 4	-	< LOD	< LOD		-	-
	1	0.94 \pm 0.07	1.06 \pm 0.04		2.56	3.06
	3	3.08 \pm 0.04	2.97 \pm 0.01		2.68	0.44
	5	5.11 \pm 0.08	5.20 \pm 0.06		1.56	1.77
Cerveza sin alcohol	-	< LOD	< LOD		-	-
	7	6.84 \pm 0.05	6.95 \pm 0.03		1.54	2.77
	9	9.19 \pm 0.02	8.88 \pm 0.01		2.72	0.44
	11	11.74 \pm 0.08	11.46 \pm 0.08		2.25	0.98

LOD: límite de detección; ^a Desviación estándar (n=3), método de adición de patrón; ^b Referencia [223];

^c Valor teórico 2.772 ($P=0.05$) ^d Valor teórico 39.00 ($P=0.05$)

- *Bisfenol A*

El análisis de las muestras fue llevado a cabo mediante el método de adición de patrón, ya que se encontró un considerable efecto matriz. La pendiente de la curva de calibrado obtenida tras la fortificación de los extractos finales con BPA era diferente de la obtenida cuando se fortificaban inicialmente las muestras de leche y ambas eran diferentes de la obtenida por calibración externa. Por tanto, las muestras fueron fortificadas con BPA antes de proceder a su pretratamiento. El efecto matriz se evaluó comparando las pendientes obtenidas por calibración externa y calibración por adición de patrón, para las diferentes muestras de leche analizadas:

$$m_{c. \text{ externa}}/m_{c. \text{ adición patrón}} \approx 1.3$$

Se analizaron catorce muestras de leche con diferente presentación (seis muestras de leche entera, dos fórmulas infantiles en polvo, tres fórmulas infantiles líquidas y tres muestras de leche en polvo). De todas ellas, se encontró BPA en tres de las muestras de leche entera y en las dos fórmulas infantiles líquidas. Sin embargo, no se detectó BPA en los preparados sólidos (fórmulas infantiles o leche en polvo). Estos resultados son consistentes con el hecho de que la migración del BPA desde los envases a los productos sólidos es poco probable, debido a que en ellos no existe un revestimiento interior del envase y a que, obviamente, la migración sería muy lenta si se compara con la que podría producirse en productos líquidos. Las concentraciones de BPA encontradas estaban en el rango de 0.38-6.31 ng mL⁻¹ (alrededor de 0.37-6.13 µg Kg⁻¹), siendo en todos los casos inferiores al MRL establecido por la Unión Europea para el contenido de BPA en leche (0.6 mg Kg⁻¹)²²⁹. Estas concentraciones de BPA son del mismo orden que las obtenidas en estudios previos^{214,230}.

Por otra parte, se llevó a cabo un estudio de recuperación, a tres niveles de concentración, en dos de las muestras en las que se encontró BPA y en dos muestras en las que éste no fue detectado (*Tabla II.22*). Los resultados obtenidos en cada caso se compararon con los encontrados por un método de referencia basado en HPLC-MS/MS²¹⁴. Los porcentajes de recuperación estuvieron en el rango 93-106%. Del estudio estadístico llevado a cabo para comparar la precisión y exactitud de ambos métodos se dedujo que no existía diferencia significativa entre los resultados de ambos métodos.

²²⁹ Commission Directive 2004/19/EC, Off. J. Eur. Communities L71 (2004) 8-21.

²³⁰ N. Casajuana, S. Lacorte, Journal of Agricultural and Food Chemistry 52 (2004) 3702-3707.

Tabla II.22. Determinación de BPA en leche

	Método propuesto		Metodo de referencia ^b		t_{calc}^c	F_{calc}^d
	Añadido (ng mL ⁻¹)	Encontrado $\pm \sigma^a$ (ng mL ⁻¹)	Encontrado $\pm \sigma^a$ (ng mL ⁻¹)			
Leche entera	-	0.38 \pm 0.06	0.40 \pm 0.03	0.55	4.00	
	0.5	0.91 \pm 0.08	0.90 \pm 0.05	0.18	2.56	
	2.0	2.21 \pm 0.03	2.31 \pm 0.08	2.03	0.14	
	5.0	5.36 \pm 0.05	5.26 \pm 0.04	2.44	1.56	
Fórmula infantil líquida	-	6.31 \pm 0.03	6.29 \pm 0.06	0.51	0.25	
	5.0	12.03 \pm 0.06	11.75 \pm 0.06	0.40	1.00	
	10.0	16.36 \pm 0.09	16.50 \pm 0.04	2.44	5.06	
	20.0	26.50 \pm 0.07	26.38 \pm 0.05	2.44	1.96	
Fórmula infantil en polvo	-	< LOD	< LOD	-	-	
	1.0	1.11 \pm 0.08	1.10 \pm 0.04	0.19	4.00	
	2.5	2.48 \pm 0.06	2.52 \pm 0.02	1.10	2.25	
	4.0	4.03 \pm 0.07	3.97 \pm 0.03	1.38	5.44	
Leche en polvo	-	< LOD	< LOD	-	-	
	1.0	1.04 \pm 0.05	0.95 \pm 0.03	2.67	2.77	
	5.0	5.10 \pm 0.05	4.99 \pm 0.05	2.68	1.00	
	10.0	9.98 \pm 0.06	10.13 \pm 0.08	2.61	0.56	

LOD: límite de detección; ^aDesviación estándar (n=3); ^bReferencia [214]; ^cValor teórico 2.772 ($P=0.05$); ^dValor teórico 39.00 ($P=0.05$)

CONCLUSIONS

Conclusions

In this Research Report eight luminescent flow-through optosensors, using MCFIA and SIA, have been developed and successfully applied to the analysis of organic compounds of interest in various matrices: food, beverages, pharmaceutical preparations and biological fluids. The following conclusions can be drawn from the present study:

1. The proposed systems exhibit high sensitivity and selectivity, being these characteristics consequence of the retention and detection of the analyte (or its reaction product) on a suitable solid support in the detection area.

2. The implementation of MCFIA and SIA in the continuous flow system has allowed increasing the degree of automation and reproducibility and significantly reducing consumption of sample and reagents, when compared with conventional FIA systems.

3. The use of photons as "reactive" in the proposed optosensors using PIF detection provides interesting characteristics for the determination of certain non-fluorescent or weakly fluorescent analytes that require a previous derivatization. The advantages of photo derivatization when compared with chemical derivatization are:

- A decrease in time of analysis as a consequence of the radicalary mechanism of the photo derivatization: a higher analytical signal is sometimes obtained in a shorter time.
- Simplicity of the flow system, lower cost of analysis and reduction of waste. These characteristics are consequence of the absence of chemical reagents which usually are expensive and/or harmful.
- An increase in sensitivity since there is no dilution of the sample by the use of chemical reagents for the derivatization of the analyte.

4. The applicability of luminescent flow-through optosensors to the determination of compounds of interest in complex matrices, such as food, has been demonstrated. Therefore, these systems can be considered as an interesting alternative to the well-established chromatographic methods.

5. For the first time, a non-chromatographic method has been proposed for the determination of RVT in beer and the concentrations of the stilbene in this matrix have been known. To date, only two chromatographic methods (HPLC-MS/MS and GC-MS) had been proposed for RVT analysis in beer, being the concentrations in real samples just below their quantification limits.

6. Two new methods based on SPE have been proposed for the pretreatment of beer and cocoa products. These methods have allowed the determination of RVT and PCD in the presence of PCD and RVT, respectively, being both serious mutual interferents.

7. The methods here proposed for the analysis of RVT and/or PCD in beer, cocoa products and wines, based on PIF, overcome the limitations of the chromatographic methods since the total of both stilbenes (*cis* plus *trans* isomers) is determined. In chromatographic methods there is risk of photoisomerization of *trans* to *cis* isomer, which makes necessary conducting all procedures in low light environments to minimize light-induced degradation. In addition, *cis* isomers are not commercially available and they only can be obtained from *trans* isomers by sunlight or UV irradiation under highly controlled conditions.

8. For the first time, a non-chromatographic method has been proposed for the determination of BPA in milk, which allows the determination of this compound at concentration levels much lower than MRLs established in European Legislation.

As future perspective, we can emphasized that this Research Report opens a promising area for the development of new strategies in luminescent flow-through optosensors applied to the analysis of complex samples, by using a simple methodology and a low-cost and automatic instrumentation.

ANEXOS

Anexo A: CONTRIBUCIONES CIENTÍFICAS DERIVADAS DE ESTA MEMORIA

1. Publicaciones científicas

En este Anexo se recogen los ocho artículos desarrollados por la autora de la presente Memoria sobre el Proyecto de Tesis presentado y admitido a trámite con fecha 29 de noviembre de 2011. Todos ellos han sido publicados en revistas científicas internacionales especializadas en las áreas de Química Analítica y Tecnología de los alimentos.

Los artículos incluidos en la Memoria son los siguientes:

1. *“Development of a rapid and automatic optosensor for the determination of cromolyn in biological samples”*, Talanta 73 (2009) 627-632.
2. *“Direct determination of cefadroxil by chemiluminescence using a multicommutated flow-through sensor”*, Spectroscopy Letters 43 (2010) 60-67.
3. *“Sensitive determination of indomethacin in pharmaceuticals and urine by sequential injection analysis and optosensing”*, Journal of AOAC International 93 (2010) 1443-1449.
4. *“A novel multicommutated fluorimetric optosensor for determination of resveratrol in beer”*, Talanta 83 (2011) 850-856.
5. *“Automatic optosensing device based on photo-induced fluorescence for determination of piceid in cocoa-containing products”*, Analytical and Bioanalytical Chemistry 399 (2011) 965-972.
6. *“An automatic optosensing device for the simultaneous determination of resveratrol and piceid in wines”*, Analytica Chimica Acta 689 (2011) 226-233.
7. *“Indirect determination of aflatoxin B₁ in beer via a multi-commuted optical sensor”*, Food Additives and Contaminants 29 (2012) 392-402.
8. *“Analysis of bisphenol A in milk by using a multicommutated fluorimetric sensor”*, Talanta, in press (DOI: 10.1016/j.talanta.2012.02.021).

2. Comunicaciones a Congresos Internacionales

1. *“Development of a rapid and automatic optosensor for the determination of cromolyn in biological samples”*, Colloquium Spectroscopicum Internationale XXXVI. Budapest (Hungria), Septiembre 2009.

2. *“Direct determination of cefadroxil by chemiluminescence using a multicommutated flow-through sensor”*, Flow Analysis XI, Pollensa (Mallorca, España), Septiembre 2009.
3. *“Photo-chemically induced fluorescence determination of resveratrol in wines by a multicommutated flow-through optosensor”*, Flow Analysis XI, Pollensa (Mallorca, España), Septiembre 2009.
4. *“Highly sensitive determination of indomethacin in biological fluids by coupling of sequential injection analysis and optosensing”*, Colloquium Spectroscopicum Internationale XXXVI. Budapest (Hungría), Septiembre 2009.
5. *“Fluorimetric determination of resveratrol in beer by a multicommutated flow-through optosensor”*, XIV International Symposium on Luminescence Spectrometry, Praga (República Checa), Julio 2010.
6. *“Multicommutated flow-through fluorimetric optosensor for determination of piceid in cocoa and chocolate”*, XIV International Symposium on Luminescence Spectrometry, Praga (República Checa), Julio 2010.
7. *“Novel multicommutated optosensor for the simultaneous determination of resveratrol and piceid in wines”*, XIV International Symposium on Luminescence Spectrometry, Praga (República Checa), Julio 2010.
8. *“Highly sensitive determination of aflatoxin B1 in beer by multicommutated optical sensor”*, 17th International Conference on Flow Injection Analysis, Cracovia (Polonia), Julio 2011.
9. *“Analysis of bisphenol A in milk by using an automatic fluorimetric sensor”*, 17th International Conference on Flow Injection Analysis, Cracovia (Polonia), Julio 2011.

Anexo B: OTRAS CONTRIBUCIONES CIENTÍFICAS

A continuación se relacionan otras contribuciones científicas adicionales que se han llevado a cabo durante la realización del presente trabajo de investigación:

1. Publicaciones científicas

1. *“Monitoring of sulfonamides by a multicommutation flow-analysis assembly: Use of quenching effect on terbium luminescence”*, Analytical Letters 43 (2010) 2283–2295.
2. *“Photo-chemically induced fluorescence determination of tigecycline by a stopped-flow multicommutated flow-analysis assembly”*, Analytical Letters 44 (2011) 127-136.
3. *“Automatic fluorescence analysis of ketorolac by direct oxidation with permanganate”*, Spectroscopy Letters 45 (2012) 219-224.

2. Comunicaciones a Congresos Internacionales

1. *“Quantitation of sulfonamides by a multicommutation flow-analysis assembly: Use of quenching effect on terbium luminescence”*, Flow Analysis XI, Pollensa (Mallorca, España), Septiembre 2009.
2. *“Photo-chemically induced fluorescence determination of tigecycline by a multicommutated flow-analysis assembly”*, Flow Analysis XI, Pollensa (Mallorca, España), Septiembre 2009.
3. *“Última tecnología en el campo de los sensores espectroscópicos en flujo”*, VIII Jornadas Doctorales Andaluzas, Almería (España), Septiembre 2010.
4. *“A rapid and automatic optosensor for the determination of ketorolac in pharmaceuticals and biological samples”*, 17th International Conference on Flow Injection Analysis, Cracovia (Polonia), Julio 2011.
5. *“Automatic luminescence flow-systems for the determination of toxic and natural compounds in foods”*, 17th International Conference on Flow Injection Analysis, Cracovia (Polonia), Julio 2011.

**Development of a rapid and automatic optosensor for
the determination of cromolyn in biological samples**

Talanta 73 (2009) 627-632



Contents lists available at ScienceDirect

Talanta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/talanta

Development of a rapid and automatic optosensor for the determination of cromolyn in biological samples

L. Molina-García, E.J. Llorent-Martínez, M.L. Fernández-de Córdova, A. Ruiz-Medina*

Department of Physical and Analytical Chemistry, Faculty of Experimental Sciences, University of Jaén, Campus las Lagunillas, E-23071 Jaén, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 October 2008

Received in revised form 15 April 2009

Accepted 21 April 2009

Available online 3 May 2009

Keywords:

Cromolyn
Sequential injection analysis
Optosensor
Urine
Pharmaceuticals

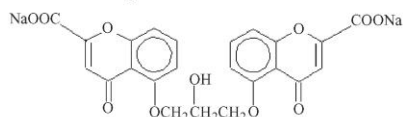
ABSTRACT

Disodium cromoglycate (SCG) is an anti-allergic drug, which is applied locally or inhaled. After administration, a very small portion of the drug is absorbed, being the most eliminated part unchanged in the urine and bile; therefore, its determination in urine is indicative of the dose absorbed. Here, the first spectroscopic method for the determination of SCG, making use of a sequential injection optosensor with terbium-sensitized luminescence detection, is described. The cationic resin Chelex-100 was used as solid support in the detection area. The measurements were made at 336/545 nm ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$) and the system was calibrated for two sample volumes, 150 and 800 μ l, depending on the samples analyzed. A detection limit of 15 ng ml⁻¹ and a RSD lower than 2% ($n = 10$) were observed using the highest sample volume. The proposed method does not use any organic solvent or surfactant, so being environmental friendly. The analyte was satisfactorily determined in pharmaceuticals and human urine, the latter being spiked at the concentrations found after the administration of the drug.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Disodium cromoglycate (SCG), also known as cromolyn, is a potent and well-known anti-allergic agent almost free from side effects and highly soluble in water. It is effective for treating asthma and allergic rhinitis [1,2] and its action mechanisms have been described as the inhibition effect against the release of the chemical mediator like histamine and the slow-reacting substance of anaphylaxis from the human lung [3]. Only a very small portion of the drug (approximately 1–3%) is absorbed by the gastrointestinal tract after oral administration [2–4]; however, after inhalation, the drug is well absorbed by the respiratory epithelium into the systemic circulation and rapidly eliminated unchanged in approximately equal proportions in the urine and bile [5]. Therefore, the urinary excretion of the drug is the indicator of the dose absorbed by the body. The structure of the drug is as follows:



Although the determination of SCG has been performed using thin-layer chromatography with densitometry detection [6] or by means of a radioimmunoassay [7] or using cathodic stripping

voltammetry [8], all the recent methods developed for the determination of SCG involve liquid chromatography [1–3,9,10]. Hence, there is a complete absence of easy-to-use spectroscopic methodologies for the determination of SCG not only in biological fluids, but also in pharmaceuticals. As a result, the development of a rapid, simple and automatic method for the routine determination of the drug in both matrices is an interesting option.

In this paper, the coupling of sequential injection analysis (SIA) and solid phase spectroscopy (SPS) employing terbium-sensitized luminescence as detection technique is reported for the determination of SCG. SIA methodology shows complete automation, rapidity and simplicity [11,12], while the introduction of SPS provides the required selectivity and sensitivity [13,14]. These last characteristics are enhanced when the solid support is employed in the same sensing zone, as it is shown in this paper.

Luminescence spectroscopy offers the possibility of more selective detection techniques, such as the use of lanthanide-sensitized luminescence. Lanthanide ions, such as europium and terbium, exhibit weak absorption coefficients and low fluorescence quantum yields. When chelated with organic ligands, such as SCG, the luminescence quantum yield is greatly enhanced; the excitation light is absorbed and collected by the organic ligand, which serves as an antenna chromophore, being this process followed by an energy transfer of the collected energy to the chelated lanthanide ion, which then emits line-like bands in the spectrum of the lanthanide ion [15,16].

Taking into account these characteristics, in this paper we propose the determination of SCG by means of the formation of a chelate with terbium (III). This is the first spectroscopic method

* Corresponding author. Tel.: +34 953 212759; fax: +34 953 212940.
E-mail address: anruiz@ujaen.es (A. Ruiz-Medina).

for the determination of this analyte not only in pharmaceuticals, but also in such a chelate matrix as human urine. The use of the solid support provides the rigidity required to enhance the luminescence intensity of the system, so avoiding the use of surfactants, commonly employed in liquid phase [15,17].

2. Experimental

2.1. Reagents and solutions

SGC, terbium (III) nitrate pentahydrate, sodium acetate and acetic acid were obtained from Sigma (Alcobendas, Madrid, Spain). Ethylenediaminetetraacetic acid sodium salt 2-hydrate (EDTA) was obtained from Panreac (Barcelona, Spain). All reagents were of analytical grade. SGC stock solution of 200 mg l^{-1} was prepared by dissolving the required weight in deionized water; it was kept in the dark under refrigeration at 4°C and remained stable for at least 3 months. Terbium (III) and EDTA stock solutions of 0.1 and 0.05 M, respectively, were prepared in deionized water.

Required SGC and terbium (III) solutions were prepared daily with suitable dilution in deionized water.

Sephadex-SP C-25 in sodium form, 40–120 μm average particle size, Sephadex-QAE A-25, 40–120 μm average particle size and Sephadex-CM C-25, 40–120 μm average particle size (all from Sigma, Alcobendas, Madrid, Spain), C_{18} bonded phase silica gel beads (Waters, Milford, USA), 55–105 μm of average particle size and Chelex-100 in sodium form, 200–400 mesh (Fluka, Buchs, Switzerland) were tested as sensing supports.

2.2. Instrumentation

Luminescence measurements were performed with a Cary-Eclipse Luminescence Spectrometer (Varian Inc., Mulgrave, Australia), controlled by a computer equipped with a Cary-Eclipse (Varian) software package for data collection and treatment. The phosphorescence mode was used for all analytical measurements. The delay and gate times used were 0.1 and 3 ms, respectively. Instrument excitation and emission slit widths were set at 10 and 20 nm, respectively. The detector voltage was 600 or 650 V depending on the sample volume used.

The SIA system was composed of a Cavro XP 3000 (Cavro Scientific Instruments, Sunnyvale, CA, USA) pump equipped with a

5 ml syringe and a Valco (Valco Instruments Co. Inc., Houston, TX, USA) 10-port selection valve. PTFE tubing of 0.8 mm internal diameter was used in the manifold; the same tubing was also used for the 2 ml holding coil. The system was computer controlled using a home-written software program (Sagittarius version 3.0.25) based on MS Visual Basic 6.0 (Microsoft). The manifold used is shown in Fig. 1.

A Hellma flow cell 176.752-QS (25 μl of inner volume and a light path length of 1.5 mm) was used. The cell was filled with Chelex-100 solid support microbeads, and was blocked at the outlet with glass wool to prevent displacement of the resin particles.

The level of the resin packed in the flow cell had to be carefully established in order to ensure that the upper part of the resin was just in the light path, so obtaining the best sensitivity.

2.3. Preparation of real samples

2.3.1. Pharmaceutical drugs

The pharmaceutical drugs were chosen in several presentations: *eye drops*, *capsules* and *solutions*. The preparation was as follows: 0.5 ml of eye drops or solution was dissolved and diluted with deionized water in a 100 ml volumetric flask; in the case of capsules, ten of them were homogenized and sample solution was prepared by accurately weighing an appropriate amount of the powder and diluted with deionized water to 100 ml in a volumetric flask. In order to obtain a SCG concentration included in the linear dynamic range, working dilutions were prepared with deionized water before measuring.

2.3.2. Urine samples

Urine samples were obtained from healthy volunteers and required no further pre-treatment; only when turbidity was observed, a filtration step was required. The samples were spiked with a suitable SCG concentration, diluted with deionized water and directly inserted in the flow system.

2.4. General SIA procedure

In order to condition the solid support when the flow cell was filled for the first time, 800 μl of the carrier solution (0.05 M sodium acetate/acetic acid solution, pH 5.9) were aspirated into the syringe pump from a reservoir and passed through the sensing zone.

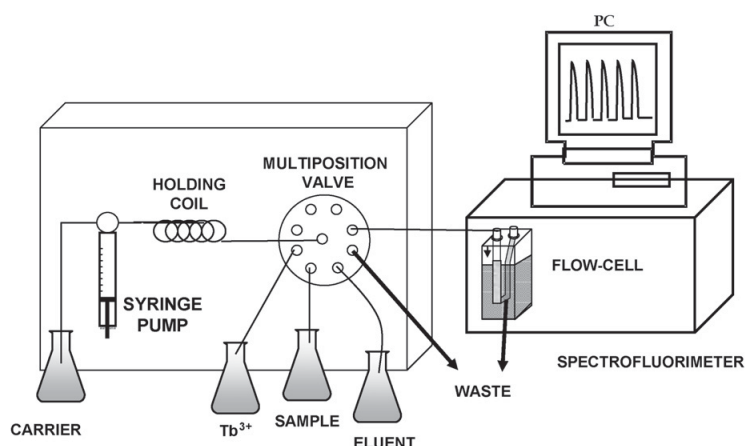


Fig. 1. Configuration of the proposed system.

2.4.1. Drug samples

Two 75 μl aliquots of sample solution and another two 75 μl aliquots of 6×10^{-3} M terbium (III) solution were sequentially aspirated, in double-sandwich mode, into the syringe pump, at a flow-rate of 5 ml min^{-1} . Next, 1 ml of carrier solution was aspirated too. Then, the mix was pumped towards the flow cell at a rate of 1.2 ml min^{-1} , passing previously through the holding coil. Once the signal from terbium (III)–SCG chelate was registered at 336/545 nm ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$), the solid support was regenerated by passing through it 1 ml of 0.05 M EDTA solution (eluent) and 1 ml of carrier solution.

Before a new injection was made, and in order to avoid samples contamination, the portion of tubing still filled with the previous sample was cleaned with 300 μl of the next sample and 500 μl of carrier solution, remaining the system ready for a new injection. This process was also performed at a flow-rate of 5 ml min^{-1} .

2.4.2. Urine samples

In this case, the procedure is the same that above described for drug samples, but the volumes of the aliquots of both sample and terbium (III) solutions injected in the system were 400 μl .

3. Results and discussion

3.1. Selection of the solid support

In lanthanide-sensitized luminescence, the efficiency of the energy transfer between the analyte (ligand) and the lanthanide ion is governed by the nature of the ion, the ligand, the ligand–ion bond and the solvent. The energy gap between the excited and

ground-state levels of the lanthanide ion and the rigidity of the molecular structure also contribute to the enhancement of the luminescence intensity of the system. Therefore, a careful selection of the solid support used for the sorption of the terbium (III)–SCG chelate provides the required rigidity of the system, avoiding the use of surfactants.

As expected, the most suitable type of solid support for the retention of terbium (III)–SCG chelate should be of cationic nature due to its probable positive charge. However, solid supports of different nature were tested: three cationic exchangers (Sephadex-SP C-25, Sephadex-CM C-25 and Chelex-100); one anionic exchanger (Sephadex QAE A-25); and one non-ionic support, silica gel C_{18} .

Different procedures were tested for the formation of the chelate between terbium (III) and the analyte: (a) on-line: sequential aspiration of terbium (III) and sample solutions into the holding coil, or aspiration of both solutions in a sandwich mode, using a holding coil and (b) off-line: direct addition of terbium (III) solution to the sample solution.

The three described procedures were tested for each solid support tested. No signal was observed for the anionic and non-ionic solid supports. In the case of the cationic supports, the best analytical signal was obtained when using Chelex-100 (an enhancement close to 80% in the signal). Hence, this last one was chosen as the optimum solid support for the sensing zone.

Usually, the use of surfactants and enhancing reagents, such as trioctylphosphine oxide, is required in order to provide rigidity to the system and to complete the coordination sphere of Tb (III). However, the use of the solid support allows to obtain similar sensitivity and to avoid these additional compounds.

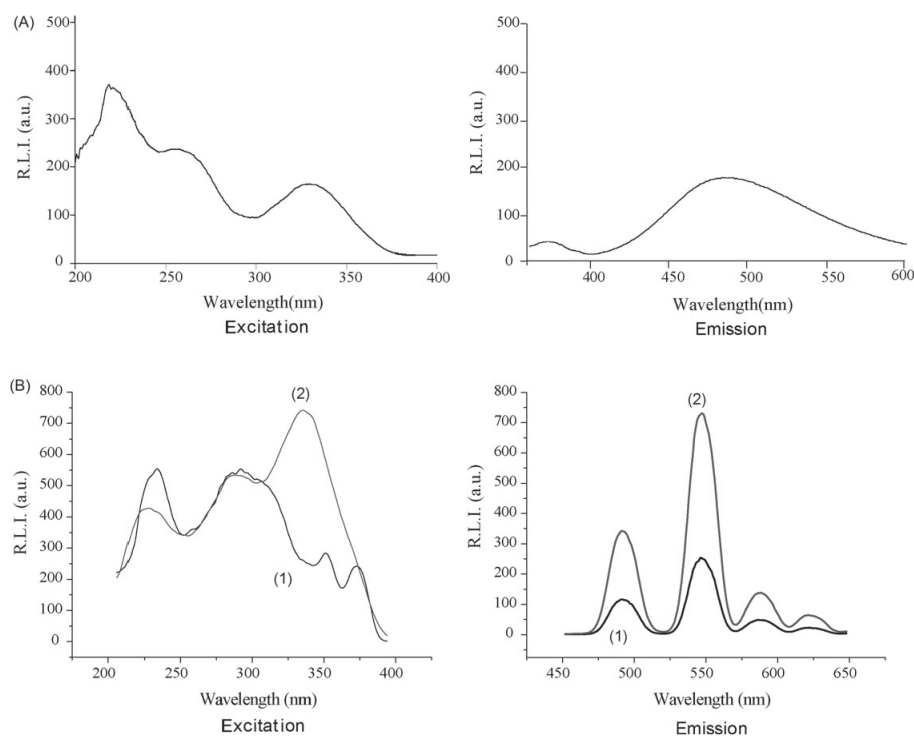


Fig. 2. (A) Fluorescence excitation and emission spectra of 5 mg l^{-1} SCG, in aqueous solution. (B) Delayed luminescence excitation and emission spectra, on the solid support, of: (1) 6×10^{-3} terbium (III) and (2) chelate between 6×10^{-3} terbium (III) and 1.2 mg l^{-1} SCG (800 μl sample volume).

3.2. Instrumental variables

As it has been previously stated, the excitation and emission wavelengths correspond to the analyte and terbium ion, respectively. To select the optimum wavelengths, the fluorescence spectra of SCG together with the delayed luminescence spectra of terbium (III) and terbium (III)–SCG chelate retained on the solid support, were recorded. These spectra are all shown in Fig. 2.

As shown in Fig. 2A, SCG presents two main excitation bands, at 230 and 336 nm, and one emission band at 485 nm. These excitation bands are also present in the excitation spectrum of the Tb (III)–SCG chelate, which is consistent with the energy transfer process from SCG to terbium (III) (Fig. 2B). Although the SCG fluorescence excitation band placed at 230 nm is more intense than the one at 336 nm (Fig. 2A) the net signal between the chelate and terbium (III) is higher when recording the spectrum at 336 nm (Fig. 2B); in addition, the solid support signal is also higher at 230 nm. Hence, 336 nm was selected as the optimum excitation wavelength.

On the other hand, three emission bands characteristic of terbium (III) can be observed around 490, 545 and 590 nm, corresponding to the $^5D_4 \rightarrow ^7F_6$, $^5D_4 \rightarrow ^7F_5$ and $^5D_4 \rightarrow ^7F_4$ transitions, respectively [15]. These bands are the same for the terbium (III)–SCG chelate (Fig. 2B). The most intense band is that situated at 545 nm and, consequently, it was chosen for the measurement of the emission.

The excitation and emission slit widths were tested in the range 5–20 nm, observing that the increase of the slit widths provided a higher net signal (the chelate terbium (III)–SCG signal minus the terbium (III) signal). On the other hand, the influence of the photomultiplier tube voltage was also studied in the range 425–700 V. In both cases, the optimum values were selected as a compromise between the highest sensitivity and the lowest blank signal (the terbium (III) signal plus the chelate signal). They are shown in Table 1.

Finally, the delay and gate times (instrumental variables available when measuring in the phosphorescence mode) were also optimized. The net signal increased when increasing the gate time and decreased when increasing the delay time. The values selected for these variables were 3 and 0.1 ms, respectively.

3.3. Chemical variables

3.3.1. Selection of the carrier solution

The pH of the carrier solution was investigated in the range 2.0–8.0. pH values above 8.0 caused the hydrolysis of terbium (III) and its precipitation. The highest net signal was observed in the pH range 5.0–6.5. Two different buffer solutions, acetate and phosphate, were tested in this pH range at several concentrations (0.01–0.2 M). For both solutions, an increase in the concentration, and consequently in the ionic strength, caused decreasing analytical signals, due to the elution of the chelate terbium (III)–SCG from the

solid support. Finally, a 0.05 M sodium acetate/acetic acid solution (pH 5.9) provided the best sensitivity and repeatability.

3.3.2. pH of sample solution

In the same way as previously described for the carrier solution, the pH of the sample solution was also studied. The maximum signal was obtained in the pH range 4.0–7.5. Higher or lower pH values caused a decrease in the signal due to a worse buffering capacity of the carrier. Therefore, it is not necessary to adjust the pH of the sample solution except in the cases in which this one is out of the optimum pH range. For this reason, before measuring the samples their pH was checked.

3.3.3. Terbium solution concentration

The concentration of the terbium (III) solution was also tested, as it was critical for the analytical signal. This study was performed for a SCG concentration within the high part of the linear dynamic range. Terbium (III) concentration was tested from 5×10^{-5} up to 8×10^{-3} M, observing that the signal increased up to a concentration 6×10^{-3} M and then remained constant. Hence, this value was selected as the optimum one.

3.3.4. Selection of the eluent

Although the carrier solution itself caused a slow elution of the terbium (III)–SCG chelate, an eluting solution had to be used to get a rapid regeneration of the solid support after the measurement. An EDTA solution was selected for this purpose. A ternary chelate, probably of anionic nature, between terbium (III), EDTA and SCG is formed and desorbed from the solid support. Different volumes and concentrations of EDTA solution were tested, finally choosing 1000 μ l of 0.05 M EDTA solution for the complete regeneration of the sensing zone.

3.4. SIA variables

Before optimizing the SIA variables, the best procedure for the formation of the chelate between terbium ion and SCG had to be decided. Taking into account one of the main goals of this paper was to provide complete automation; different approaches were studied for making the formation of the chelate on-line instead of off-line. Although the reaction between terbium and SCG is produced instantaneously, the mixture between both solutions was not homogenous using just the holding coil. Therefore, two different strategies were employed: (a) sequential aspiration of terbium and SCG solutions into the holding coil and using a reactor placed before the flow-through cell; (b) aspirating several aliquots of terbium and sample solution sequentially into the holding coil.

The second strategy provided better results in terms of speed (10% higher) and sensitivity (15% higher) therefore it was the selected one. In addition, two different approaches were studied here: (a) sandwich mode: terbium–SCG–terbium; (b) aspirating two aliquots of each solution: terbium–SCG–terbium–SCG. This second mode provided the best sensitivity, as the mixture between both solutions was clearly favored. Hence, the “double-sandwich” mode was employed.

The effect of the SIA variables was also evaluated: volume of solutions (sample, carrier and eluting solution) and flow-rate.

3.4.1. Volume of solutions

When increasing the volume of the sample aspirated, the amount of chelate sorbed on the resin also increases; this increase makes the analytical response higher and, thus, the sensitivity is improved. However, the sampling frequency diminishes with the volume increase, making it necessary to adopt a compromise solution. The sample volume was varied from 100 up to 1200 μ l, noticing that the analytical signal increased linearly only

Table 1
Analytical parameters.

Parameter	Sample volume	
	150 μ l	800 μ l
Excitation/emission slits (nm/nm)	10/20	10/20
Photomultiplier tube voltage (V)	650	600
Blank signal	290	245
Linear dynamic range (mg l^{-1})	0.2–4	0.05–2
Detection limit (mg l^{-1})	0.06	0.015
Quantitation limit (mg l^{-1})	0.2	0.05
RSD (%) ($n = 10$)	1.8 ^a	1.6 ^b
Sampling frequency (h^{-1})	12	11

^a SCG concentration, 1 mg l^{-1} .

^b SCG concentration, 0.4 mg l^{-1} .

up to 800 μl . Therefore, 150 and 800 μl were the volumes used for pharmaceuticals and urine samples, respectively. These volumes produced the required sensitivity, as long as obtaining a higher sampling frequency in the case of pharmaceuticals.

The volumes of carrier and EDTA solutions were also studied, obtaining as optimum values for the complete regeneration of the sensing zone 1 ml for each solution. In the case of terbium the same volumes of sample and terbium solutions were used depending on the applications, i.e., 150 or 800 μl for pharmaceuticals or urine samples, respectively.

3.4.2. Flow-rate

The flow-rate was investigated from 0.4 up to 1.8 ml min^{-1} (using an 1 mg l^{-1} SGC solution). By increasing it, the sampling frequency increased but the analytical signal decreased and the possibility of overpressures in the system has to be taken into account too. The signal was observed to decrease very slightly up to 1.2 ml min^{-1} ; hence, this last one was the chosen flow-rate as a compromise between sensitivity and sample-throughput. The flow-rate employed for solutions' aspiration into the syringe pump and holding coil was 5 ml min^{-1} .

3.5. Figures of merit

Taking into account the optimized conditions, the analytical parameters of the system were studied for two different sample volumes, 150 and 800 μl (Table 1). The proposed methodology was able to produce analytical fits with good linearity in the range 0.2–4 and 0.05–2 mg l^{-1} . The data were fitted by standard least-squares calibration.

The repeatability was established for ten independent analyses of sample solutions, obtaining RSDs lower than 2% for both calibration volumes. The detection limit was estimated as the concentration of analyte which produced an analytical signal equal to three times the standard deviation of the background luminescence [18]. A detection limit as low as 0.015 mg l^{-1} , when using 800 μl sample volume, was obtained. The quantitation limit ($K=10$) [19] and the sampling frequency were also evaluated. The solid support used allowed making at least 150 determinations before replacing it.

3.6. Interference study

Since the determination of SCG was carried out in both pharmaceuticals and human urine, the possible interference from different organic and inorganic species which can be found along with the analyte in these samples was tested. This study was performed by adding different amounts of the possible interfering species to a solution containing 400 ng ml^{-1} of SCG. A foreign species was considered not to interfere if it produced an error smaller than $\pm 2\sigma$ in the analytical signal, being σ the standard deviation. If any interference was observed, the ratio interfering species:analyte (w:w) was reduced progressively until this interference ceased.

In the case of pharmaceuticals, the excipients tested were lactose, saccharose, glucose and starch, obtaining tolerated interfering species/analyte ratios (w/w) higher than 1000. For biological fluids, the tolerated ratios were also above 1000 for Na^+ , K^+ , NH_4^+ , Cl^- , I^- , and NO_3^- ; above 400 for urea, Mg^{2+} , SO_4^{2-} and PO_4^{3-} ; above 80 for Ca^{2+} , CO_3^{2-} and uric acid; and 3 for Cu^{2+} and Fe^{3+} . In all cases, the tolerated ratios observed were higher than the ones normally found in real samples. Checking all these values, Cu^{2+} and Fe^{3+} are the species with higher interference effect. Nevertheless, their levels in urine are lower than the tolerated ratio, making it possible to determine SCG in this matrix with the proposed system. By comparing the tolerated ratios of Cu^{2+} and Fe^{3+} obtained in homogenous

Table 2
Determination and recovery study in pharmaceutical preparations.

Pharmaceutical	Added (mg ml^{-1})	Recovery (%)	RSD (%) ^a
<i>Cusicrom fuerte</i> (Ltd. Cusi) ^b	–	102	0.8
	20	104	2.1
	40	97	1.5
	60	103	1.2
<i>Frenal Compositum</i> (Ltd. Sigma-tau) ^c	–	103	1.5
	10 mg	103	2.2
	20 mg	101	1.8
	40 mg	97	1.6
<i>Cusicrom fuerte</i> (Ltd. Alcon) ^d	–	98	2.4
	25	97	2.2
	50	104	1.2
	75	99	0.7

^a Means of three determinations.

^b 40 mg ml^{-1} .

^c 20 mg per capsule.

^d 40 mg ml^{-1} .

solution with the ratios observed in solid phase, we found that the use of the sensing zone enhanced the tolerance to these metals a hundredfold. For this reason, it would not be possible to perform the determination of SCG in homogenous solution without a previous elimination of both species.

It is worthy mentioning that this increase in the selectivity is mainly achieved by the use of the solid support, since it allows the discrimination between terbium (III)–SCG chelate and the possible interfering species in the sorption on the solid support.

3.7. Analytical applications

Following the procedure previously described, the proposed optosensor was applied to the determination of SCG in both pharmaceuticals and human urine.

Pharmaceutical samples, prepared as described under Section 2.3, were introduced by triplicate into the system. Three pharmaceuticals available in the Spanish Pharmacopoeia were analyzed: capsules (*Frenal compositum*), a solution (*Cusicrom fuerte*) and eye drops (*Cusicrom fuerte*). In all cases, the SCG amounts determined by the proposed method were in good agreement with those ones provided by the manufacturer. In order to evaluate the accuracy of the method, a recovery study was also performed by adding three different levels of SCG concentration to the tested pharmaceuticals. The results obtained are shown in Table 2, with recoveries ranging from 97 up to 104% and RSDs lower than 3% in all cases.

In the case of urine samples, since SCG was not detected in the samples coming from healthy volunteers, a recovery study was carried out. Four different samples were spiked with known amounts of SCG (ranging from 0.5 up to 12 $\mu\text{g ml}^{-1}$) and then, the required dilutions with deionized water were made. The spiked amounts of SCG in human urine were those providing the expected concentrations after administration of the pharmaceutical [2]. Satisfactory recoveries were obtained in all cases (Table 3) demonstrating the applicability of the proposed method.

3.8. Conclusions

For the first time, a spectroscopic method has been developed for the determination of SCG. By means of using sequential injection analysis, the proposed method presents a complete automation, making it suitable for routine determination of the analyte. In addition, the employment of the solid support in the flow-through cell, as long as a highly selective and sensitive determination technique, terbium-sensitized luminescence, makes it possible to determine

Table 3
Recovery study in urine.

Sample	Spiked ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Found ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Recovery (%) \pm RSD ^a
Urine-1	1	1.02	102 \pm 2
	2	2.10	105 \pm 2
	4	3.90	98 \pm 1
Urine-2	0.5	0.52	104 \pm 3
	1	1.07	107 \pm 2
	2	1.94	97 \pm 2
Urine-3	5	5.15	103 \pm 1
	10	9.60	96 \pm 1
	12	12.50	104 \pm 2
Urine-4	3	2.90	97 \pm 1
	6	6.06	101 \pm 2
	8	7.80	98 \pm 1

^a Means of three determinations.

SCG not only in pharmaceuticals, but also in human urine at the levels normally found in patients after the drug administration. The employment of the solid support provides also the required rigidity to the system, making the use of surfactants unnecessary and, therefore, allowing the development of environmental friendly methodologies. The recovery study performed in human urine demonstrates the accuracy and selectivity of the method, requiring no pre-treatment for the samples. These results allow the easy and rapid analysis of SCG using a non-costly analytical instrumentation.

Acknowledgment

The authors are grateful to the “Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa (Junta de Andalucía)”, Project P07-FQM-02673, for financial support.

References

- [1] Z. John Lin, R. Abbas, L.M. Rusch, L. Shum, J. Chromatogr. B 788 (2003) 159.
- [2] M. Lindström, J. Olof Svensson, L. Meurling, K. Svartengren, M. Anderson, M. Svartengren, Respir. Med. 98 (2004) 9.
- [3] K. Mawatari, S. Mashiko, Y. Sate, Y. Usui, F. Ilinuma, M. Watanabe, Analyst 122 (1997) 715.
- [4] G.G. Shapiro, P. Konig, Pharmacotherapy 5 (1985) 156.
- [5] G.F. Moss, K.M. Jones, J.T. Ritchie, J.S. Cox, Toxicol. Appl. Pharmacol. 24 (1972) 525.
- [6] V. Kocic-Pesic, D. Radulovic, D. Pecanac, L. Zivanovic, Farmaco 47 (1992) 1563.
- [7] K. Brown, J.J. Gardner, W.J.S. Lockley, J.R. Preston, D.J. Wilkinson, Ann. Clin. Biochem. 20 (1983) 31.
- [8] F.C. Pereira, A.G. Fogg, M.V.B. Zanoni, Talanta 60 (2003) 1023.
- [9] O.A. Aswania, S.A. Corlett, H. Chrystyn, J. Chromatogr. B 690 (1997) 373.
- [10] M.L. Ozoux, J. Girault, J.M. Malgouyat, O. Pasquier, J. Chromatogr. B 765 (2001) 179.
- [11] J. Ruzicka, G.D. Marshall, Anal. Chim. Acta 237 (1990) 329.
- [12] C. Frank, F. Schroeder, R. Ebinghaus, W. Ruck, Talanta 70 (2006) 513.
- [13] A. Molina-Díaz, A. Ruiz-Medina, M.L. Fernández-de Córdoba, J. Pharm. Biomed. Anal. 28 (2002) 399.
- [14] A. Domínguez-Vidal, P. Ortega-Barrales, A. Molina-Díaz, Talanta 56 (2002) 1005.
- [15] N. Arnaud, J. Georges, Analyst 124 (1999) 1075.
- [16] E.J. Llorent-Martínez, P. Ortega-Barrales, A. Molina-Díaz, Anal. Biochem. 347 (2005) 330.
- [17] N. Arnaud, J. Georges, Anal. Chim. Acta 476 (2003) 149.
- [18] IUPAC, Spectrochim. Acta B 33 (1976) 241.
- [19] D. MacDougall, W.B. Crummett, et al., Anal. Chem. 52 (1980) 2242.

**Direct determination of cefadroxil by chemiluminescence
using a multicommutated flow-through sensor.**

Spectroscopy Letters 43 (2010) 60-67

Direct Determination of Cefadroxil by Chemiluminescence Using a Multicommutated Flow-Through Sensor

L. Molina-García,
 E. J. Llorent-Martínez,
 M. L. Fernández-de Córdoba,
 and A. Ruiz-Medina

Department of Physical and Analytical Chemistry, Faculty of Experimental Sciences, University of Jaén, Campus Las Lagunillas, Jaén, Spain

ABSTRACT A selective and direct chemiluminescence method was developed for the determination of cefadroxil, a broad-spectrum antibiotic effective in gram-positive and gram-negative bacterial infections. The method involves the implementation of solid-phase spectroscopy in a multicommutated flow system. The solid support is placed in the flow-through cell, and the reaction between the oxidant reagent (permanganate) and cefadroxil takes place on the microbeads, so yielding the analytical signal. The system showed a linear dynamic range of 2.7–110 μM , with a detection limit of 0.8 μM and an RSD of 3.3% ($n=10$). The analyte was satisfactorily determined in pharmaceutical preparations and human urine.

KEYWORDS cefadroxil, chemiluminescence, multicommutation, sensor, SPS

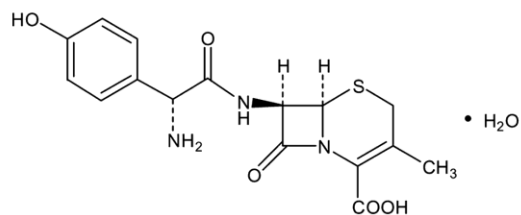
INTRODUCTION

Cefadroxil monohydrate (CFD) is a semisynthetic cephalosporin antibiotic used in clinical practice for treatment of serious infections caused by susceptible strains of microorganisms in the following diseases: lower respiratory infections, genitor-urinary infections (*E. coli*, *P. mirabilis*, and *Klebsiella* species), gynecologic infections, skin infections (*Staphylococci* and/or *Streptococci*), pharyngitis and/or tonsillitis (*Streptococcus pyogenes*; Group A beta-hemolytic streptococci), and central nervous system infections.

Cephalosporins operate by inhibiting active bacterial cell wall biosynthesis that grows actively against a wide range of both gram-positive and gram-negative bacteria. The positive results of these drugs include the resistance of penicillinases and ability to treat of infections that are resistant to penicillin derivatives. Side effects of the CFD include nausea, epigastria distress, diarrhea, vomiting, skin rash, genital pruritus, pseudo membranous colitis, and genital moniliasis.^[1] However, people who are allergic to penicillin may have similar reactions when taking cephalosporin antibiotics such as CFD. It is chemically designated as [6R[6a,7b(R*)]]-7-[N'-(2'-amino,2'-(4''-hydroxyphenyl)acetyl)-amino]-1-aza-3-methyl-8-oxo-5-thiabicyclo

Address correspondence to
 A. Ruiz-Medina, Department of
 Physical and Analytical Chemistry,
 Faculty of Experimental Sciences,
 University of Jaén, Campus Las
 Lagunillas, E-23071 Jaén, Spain.
 E-mail: anruiz@ujaen.es

[4.2.0]oct-2-ene-2-carboxylic acid monohydrate, presenting the following structure:



Different analytical techniques have been reported for the determination of CFD in pharmaceuticals and/or biological fluids. Although there are some methods involving liquid chromatography with spectrophotometric detection^[2,3] or even a voltammetric method,^[4] most of the developed methods to date involve spectrophotometry^[5–7] or spectrofluorimetry.^[8,9] Chemiluminescence (CL) has also been employed. Analytical methods with CL detection^[10–13] provide several advantages for determining CFD such as high sensitivity, small amount of chemical consumption, and instrumental simplicity. Most of them use flow injection analysis as well as different compounds to obtain an enhancement in the CL signal.

Nevertheless, it must be taken into account that many CL reactions are so fast that they give rise to imprecise measurements as a result of irreproducible mixing of sample and reagents. It happens, normally, by using batch mode or conventional flow methodologies. To avoid these problems in CL analysis, recent developments in flow analysis are being implemented. They have progressively achieved improvement of sample and reagents consumption, repeatability of the methods, and degree of automation of the systems. For examples, sequential injection analysis,^[14] multisyringe flow injection analysis,^[15] and multicommutated flow analysis^[16] can be cited as the most important methodologies currently used. The combination of these new methodologies with solid-phase spectroscopy (SPS) has allowed the development of a new generation of sensors. They play an important role by offering additional separation devices and clean-up steps for analyzing complex matrices. In particular, the use of a solid support in a flow-through cell is introduced with the aim of improving the sensitivity and selectivity of the system,^[17] as long as one avoids the use of additional enhancement reagents,

commonly used in homogeneous solution.^[18] The solid support could be used for the retention of the reagents, the target analyte, or even the product of the reaction. The enhancement in selectivity makes it possible to analyze complex samples, such as biological fluids, and that analysis would probably not be possible in homogeneous solution due to the high number of interfering species. For all these reasons, the combination of automatic methods with CL detection is becoming increasingly important in clinical and biological analysis.

The main goal of this article is to develop an automatic flow-through CL sensor for the direct determination of CFD, without fluorescing compound or additional reagent that produces the acceleration of the oxidation reaction rate.^[10] The use of multicommutation is introduced due to its favorable intrinsic advantages such as low-cost equipment, high sample throughput, and simplicity, as long as automation is complete.^[19] The proposed optosensor shows a linear dynamic range, repeatability, rapidity, and feasibility, showing satisfactory results when it is applied to the determination of CFD in pharmaceutical preparations and urine samples.

MATERIALS AND METHODS

Reagents and Solutions

CFD, potassium permanganate, sulphuric acid, acetonitrile, quinine, and formaldehyde were obtained from Sigma (Alcobendas; Madrid, Spain). All reagents were of analytical grade. The solid supports—Sephadex-SP C-25, Sephadex-QAE A-25, and Sephadex-DEAE A-25—all of them having 40–120- μm average particle size—were obtained from Sigma; C_{18} bonded phase silica gel beads, with 55–105- μm average particle size, was obtained from Waters (Milford, U.S.). Filters (Waters), with 2.7- μm pore size, were also used.

CFD stock solution of 500 μM was prepared by dissolving the required weight in deionized water; it was kept in the dark under refrigeration at 4°C and remained stable for at least 3 months. Required CFD solutions were prepared daily by suitable dilution with 0.1-M H_2SO_4 . A stock 0.01-M solution of potassium permanganate was prepared daily and standardized before use; working solutions were obtained by dilution with deionized water.

Direct Determination of Cefadroxil by Chemiluminescence

Instrumentation

Homemade Luminometer

The photosensor module H8240–101 was obtained from Hamamatsu (U.S.) and consists of a 28-mm diameter side-on photomultiplier tube (PMT), a high-voltage power supply circuit, and a low-noise amplifier; the spectral response is 185–900 nm. The flow-through cell Hellma 137-QS (Hellma Hispania, S.L., Badalona, Spain) (1-mm light path and 260- μ L inner volume) was employed. The cell was blocked at the outlet with glass wool to prevent displacement of the resin particles.

Both the flow cell and the photosensor module were encased in a light-tight homemade box, and the box was wrapped in black cloth. The cell was placed in front of the window of the photosensor module, with effective area of 4×20 mm; in addition, a piece of mirror was stuck in the back of the cell in order to collect the whole emission light.

The photosensor module requires a ± 15 -V power supply, being the gain adjusted with an additional power supply, from 0.3 V up to 1.1 V. For acquiring the voltage provided by the photosensor module, the connector block SCB-68 and the NI-PCI-6221 M Series Multifunction DAQ Device from National Instruments (Madrid, Spain) were used. Data acquired by the PCI-6221 device were registered using VI Logger Datalogging Software (National Instruments, U.S.). Registered data were smoothed using the software Origin Pro 7.0 (OriginLab, U.S.).

Multicommutation System

The multicommutation system was built using a four-channel Gilson Minipuls-3 peristaltic pump (Vil-liers le Bel, France) fitted with a rate selector and pump tubing type Solvflex (Elkay Products, Shrewsbury, MA, U.S.). An electronic interface based on ULN 2803 integrated circuits (Unisonic Technologies Co., Ltd.; Da-Lian, China) was employed to generate the electric potential (12 V) and current (100 mA) required to control the four 161T031 NResearch three-way solenoid valves (Neptune Research; MA, U.S.). The home-made software for controlling the system was developed in Java. PTFE tubing of 0.8-mm i.d. and methacrylate connections were also used.

Other Apparatus

Other apparatus consisted of a Crison Model 2002 pH meter with a glass/saturated calomel combination

electrode (Crison; Barcelona, Spain), a Selecta Ultrasons ultrasonic bath (Selecta; Barcelona, Spain), and a Selecta centrifuge S-240 (Selecta; Barcelona, Spain).

Preparation of Samples

Pharmaceuticals

Three pharmaceuticals available in the Spanish Pharmacopoeia, presented in the form of syrup and capsules, were analyzed. The syrup *Duracef* was presented as soluble powder; the whole powder was dissolved in deionized water (200 mL). In the case of the capsules *Cefadroxilo Sabater* and *Duracef*, two capsules of each pharmaceutical were dissolved in deionized water (500 mL). Appropriate dilutions with 0.1-M H_2SO_4 were made before measuring.

Urine Samples

Antibiotic-free urine samples were obtained from healthy volunteers. An appropriate aliquot of CFD stock solution and 2 mL of acetonitrile were added to 4 mL of urine sample. The solution was blended on a vortex mixer and centrifuged at 3000 rpm for 10 min. This solution was filtered through a 0.45- μ m membrane filter (Millipore; U.S.) and diluted to volume with deionized water. The required dilution with 0.1-M H_2SO_4 was made before introduction into the flow system.

General Procedure

Multicommutated flow systems are typically constituted by a peristaltic pump and a set of three-way solenoid valves automatically controlled by appropriate software.^[20] Each solenoid valve acts as a switch between two different positions, "OFF" and "ON", meaning that two of the three valve ports are permanently connected. The OFF position is the initial state of the valve, when the solenoid does not receive any electric signal; when a signal is applied, the position of the solenoid changes, and this state is called *ON position*. The manifold and the different positions of the valves are shown in Fig. 1.

In the initial condition, all valves are switched off, and the carrier solution (0.4-M H_2SO_4) is flowing through the flow cell, while all other solutions are recycling to their vessels. The steps for each sample determination were (see also scheme in Fig. 2)

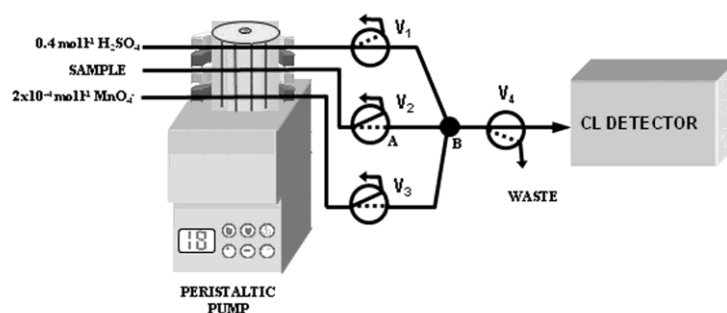


FIGURE 1 Manifold. For each solenoid valve, V_1, V_2, \dots , the solid and dotted lines refer to the 'OFF' and 'ON' positions respectively; solutions are flowing through the solid lines when no signal is applied to the solenoid.

(1) cleaning the portion of tubing placed between Points A and B (Fig. 1), filled with the last sample analyzed; (2) introducing the permanganate solution (2×10^{-4} M) by switching the valves V_1 and V_3 on for 70 s; (3) allowing the carrier solution to flow for 10 s in order to avoid the mixing of permanganate and CFD before they reach the sensing zone; (4) introducing the sample (2.7–110- μ M CFD solution) into the system for 70 s by switching on the valves V_1 and V_2 ; and (5) finally, obtaining the analytical signal (CL emission intensity as peak height), being the solid support regenerated by the carrier solution. We employed 1.3-mL min^{-1} as flow rate.

RESULTS AND DISCUSSION

Selection of the Solid Support

The reaction between CFD and the reagent (permanganate) occurs on the solid support placed in the flow-through cell, so the retention of both compounds on the microbeads is required. It allows avoiding the reagent consumption during the

reaction. The study of the appropriate solid support was carried out by using a solution of 0.4-M sulphuric acid as carrier, due to the need for an acidic medium to obtain the CL reaction.

Several solid supports were tested, while different orders of solutions (CFD and permanganate) were introduced into the flow system. Cationic exchangers and nonionic solid supports such as Sephadex-SP C-25 and C₁₈, respectively, provided no signal, regardless of the order of reagents introduction. As expected, in the case of anionic exchangers (Sephadex-QAE A-25 and DEAE A-25), significant signals were obtained only when permanganate was first introduced into the system, followed by CFD. This can be easily explained by taking into account that permanganate ion is strongly sorbed on the anionic exchangers, and that sorption can be visually observed, whereas CFD is only slightly retained. Of both solid supports tested, Sephadex-QAE A-25 provided the highest sensitivity (an improvement of 25% with respect to the use of the other anion exchanger). Hence, these microbeads were employed for further experiments.

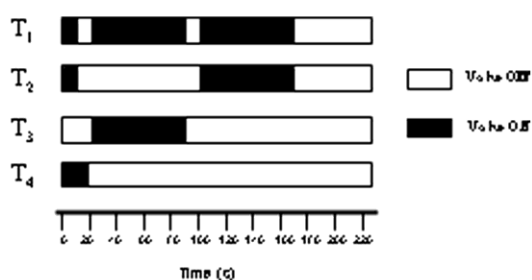


FIGURE 2 Valves scheme. T_1, T_2, \dots refer to the timing courses of solenoid valves V_1, V_2, \dots

Instrumental Variables

In the case of instrumental variables, taking into account that the analytical signal is obtained from a CL reaction, the instrument required is merely a photomultiplier tube (PMT), so that no filters or excitation lamp is needed. Two power supplies are employed: One is used at ± 15 V to provide the required energy, and the other is used to adjust the control voltage in order to control the gain of the PMT and, therefore, sensitivity. The gain

adjustment can be controlled from 0.30 V up to 1.10 V. When one uses low-gain adjustment, the repeatability of the system is better, but a very low sensitivity is obtained. We decided to use a gain of 0.85 V to obtain good repeatability (3.3% RSD) with enough sensitivity for the determination of CFD in both pharmaceuticals and urine samples. The research was performed at room temperature, observing no difference in the analytical signal between 14°C and 28°C.

Chemical Variables

Selection of the Carrier Solution

The reaction of several analytes with permanganate has been previously reported, and a strongly acidic medium is usually required.^[18] Therefore, 0.5-M solutions of different acids (sulphuric, nitric, and hydrochloric acids) were tested in order to obtain the highest possible analytical signal. The conditions used were 55- μ M CFD and 2×10^{-4} -M permanganate solutions. The best results in terms of sensitivity and repeatability were observed when using sulphuric acid, and thus this one was finally chosen.

The sulphuric acid concentration was also studied over the range 0.2–0.8 M. The signal increased to a 0.4-M concentration and then remained constant up to 0.5 M. Higher concentrations originated a decrease of the analytical signal due to the high ionic strength that prevented the analyte retention. Hence, 0.4 M was selected as optimum.

Sample Solution

The nature of the sample solution was studied with the previously described working conditions. The best results were obtained when dissolving the CFD in a slightly acidic solution instead of deionized water (an increase of 25% in the analytical signal). When sulphuric acid was used for this purpose, the signal obtained was practically the same with concentrations between 0.1 and 0.3 M, although a better repeatability was observed when using 0.1-M solution.

In addition, the use of additional reagents was tested in order to obtain different emitting species to enhance sensitivity, such as singlet oxygen species or compounds accepting energy from the excited intermediate of the reaction. As a result,

formaldehyde and quinine were tested. Quinine did not improve the analytical signal; however, it was increased two-fold when formaldehyde was used. Nevertheless, the use of the solid support makes possible a slight retention of CFD, therefore allowing one to reach the necessary sensitivity for applications required. Hence, the use of additional enhancing reagents and surfactants was avoided.

Oxidant Solution

Permanganate is the most widely used CL reagent. As it has been previously reported, the emitting species in the reactions between permanganate and others compounds can be a reduction product of permanganate, probably excited Mn(II).^[18] With the purpose of obtaining the direct oxidation of the analyte and therefore avoiding the use of additional reagents, we decided to test it for the CL reaction. Using the previously optimized conditions for both carrier and sample solutions and employing a 110- μ M CFD solution, we tested the concentration of permanganate. The same insertion times of permanganate and sample solutions were employed in this study (70 s). The concentration of permanganate was tested from 10^{-5} M up to 4×10^{-4} M. The signal increased up to 2×10^{-4} M, remaining constant up to 4×10^{-4} M. As a result, 2×10^{-4} M permanganate solution was selected as optimum. In this case, a high volume of reagent (instead of high concentration and low volume) was chosen in order to obtain a homogeneous distribution of the permanganate ions on the solid support.

Flow-System Variables

The insertion times of sample and permanganate solutions and the flow-rate provided by the peristaltic pump were the flow variables under study. It has to be stated that the main difference between multi-commutation and other flow methodologies is that insertion volumes are replaced with insertion times. Knowing the flow rate and the insertion time, one can easily calculate the volume if required.

The flow rate was studied in the range 0.6–1.4 mL min⁻¹. As a general rule, in SPS, the analytical signal (maintaining the sample volume constant) diminishes when increasing the flow rate, due to a lower retention of the analyte on the solid support. In this particular case, no significant differences in

the analytical signal were observed in the studied flow-rate range. This effect is due to the high acidic medium, which causes the analyte to be retained only slightly on the microbeads. In order to obtain the maximum sample throughput, the highest possible flow rate, 1.3 mL min^{-1} , was selected, taking into account that higher flow rates caused overpressures in the system.

On the other hand, when increasing the sample insertion time, we found that the analytical signal rises due to a higher amount of CFD sorbed on the solid support and, therefore, an increase in the CL reaction product generated. Hence, sensitivity is improved, although the sampling frequency diminishes. The study of this variable was carried out from 10 s up to 100 s for both sample and permanganate solutions (see Fig. 3). The analytical signal increased up to 70 s and then remained constant. A 70-s insertion time was selected for both sample and permanganate solutions. However, the low sensitivity required when analyzing CFD in pharmaceuticals makes it possible to use lower insertion times and so drastically improves the sample throughput.

Figures of Merit

Taking into account the optimized conditions, we studied the analytical parameters of the system. Table 1 shows the figures of merit of the method proposed for the determination of CFD. The data were fitted by standard least-squares treatment. The

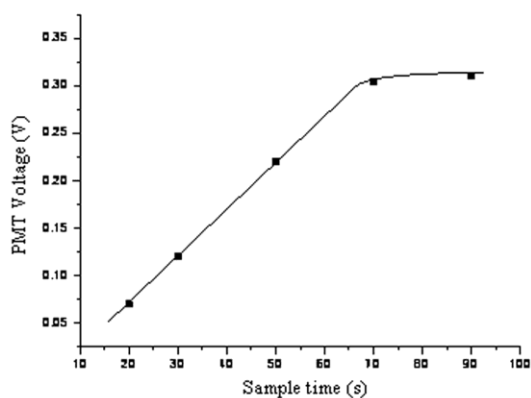


FIGURE 3 Study of the influence of the time of sample insertion on the analytical signal. [CFD] = $30 \mu\text{M}$.

TABLE 1 Analytical Parameters

Parameter	Value
Linear dynamic range (μM)	2.7–110
Calibration graph	
Intercept	0.0002
Slope (μM^{-1})	0.0135
Correlation coefficient	0.9992
Detection limit (μM)	0.8
Quantification limit (μM)	2.7
Intraday RSD (%) ^a ($n = 10$)	3.3
Interday RSD (%) ^a ($n = 10$)	6.5
Sampling frequency (h^{-1})	16

^aFor a concentration level of $55 \mu\text{M}$.

proposed methodology was able to produce analytical fits with good linearity in the range 2.7–110- μM CFD. The sampling frequency was also evaluated, yielding a high value due to the regeneration of the sensor with the carrier solution itself.

Intraday repeatability was established for 10 independent analyses of sample solutions containing $55 \mu\text{M}$ of CFD. RSDs obtained were low, even though the measurements are made in a solid phase. Interday repeatability was also performed for 10 consecutive days. Detection and quantification limits were estimated as the concentrations of analyte that produced an analytical signal equal to 3 and 10 times the standard deviation of the background luminescence, respectively.^[21] They are low enough to perform the analysis of CFD in pharmaceutical and urine samples. The use of the solid support has proved appropriate to obtain the required sensitivity, enabling one to avoid the use of additional potentially pollutant reagents commonly used in conventional CL flow systems.

Interference Study

Since the determination of CFD was performed in pharmaceutical preparations and human urine, the possible interference from different organic and inorganic species that can be found with the analyte in these samples was tested. This study was performed by adding different amounts of the possible interfering species to a solution containing $30 \mu\text{M}$ of CFD. A foreign species was considered not to interfere if it produced an error smaller than $\pm 2 \sigma$ in the analytical signal, where σ is the standard deviation. If any interference was observed, the ratio of

Direct Determination of Cefadroxil by Chemiluminescence

TABLE 2 Effect of Foreign Species

Foreign species	Tolerated interferent/analyte (w/w) ratio ^a
Lactose, saccharose, glucose, starch	> 500 ^b
Na ⁺ , K ⁺ , Cl ⁻ , I ⁻ , NO ₃ ⁻ , CO ₃ ²⁻ , PO ₄ ³⁻	> 500 ^b
Urea, Mg ²⁺	400
Uric acid, Ca ²⁺ , Cu ²⁺	300
Fe ³⁺	16

^aFor a 30 μM CFD concentration.^bMaximum ratio tested.

interfering species to analyte (w:w) was reduced progressively until this interference ceased. The results are shown in Table 2.

The observed high tolerance of the presence of foreign species is due to both the direct measurement of the solid support and the CL detection, making possible the determination of CFD in complex matrices, such as urine samples. The lower tolerance of the presence of ferric ion can be explained by taking into account its oxidant character and so its interference in the CL reaction. The determination of CFD in homogeneous solution in the presence of many of these interfering compounds would be very difficult or almost impossible, therefore demonstrating the suitability of the solid support.

TABLE 3 Determination and Recovery Study in Pharmaceutical Preparations

Pharmaceutical	Added (mg)	Recovery (%)	RSD (%) ^c
<i>Duracef (Juste)</i> ^a	—	98	1.6
	200	102	1.3
	400	104	2.2
	600	96	0.9
<i>Duracef (Juste)</i> ^b	—	102	0.8
	20 mg mL ⁻¹	104	2.1
	40 mg mL ⁻¹	97	1.5
	60 mg mL ⁻¹	103	1.2
<i>Cefadroxilo Sabater (Generfarma S.L.)</i> ^a	—	103	1.5
	100	103	2.2
	200	101	1.8
	400	97	1.6

^a500 mg per capsule.^b250 mg/5 mL.^cMeans of three determinations.**TABLE 4** Recovery Study in Human Urine

Sample	Spiked (mM)	Recovery (%)	R.S.D. (%) ^a
Urine-1	2.0	95	3.5
	2.5	101	3.4
	3	97	2.8
Urine-2	2.5	96	3.2
	3.5	102	2.1
	4.5	98	2.9
Urine-3	3.5	97	4.1
	4.5	98	3.5
	5.5	100	2.9

^aMeans from three determinations.

Analytical Applications

Following the previously described procedure, the determination of CFD in pharmaceutical preparations and in urine samples was carried out.

Pharmaceutical samples, prepared as described under the section Sample Preparation, were introduced by triplicate into the system. In all cases, the analyte amounts determined by the proposed method were in good agreement with the ones provided by the manufacturer. In order to evaluate the accuracy of the method, a recovery study was also performed by spiking the pharmaceuticals with CFD at three different concentration levels. The results obtained are shown in Table 3. Recoveries ranged in all the cases from 96% up to 104%, achieving RSDs lower than 2.5%.

Antibiotic-free urine samples gave relatively high CL intensity when no pre-treatment was applied. For this reason, it was necessary to minimize this interference. A recovery study was performed by adding CFD to different urine samples; the amounts of CFD added were those usually found after administration of a pharmaceutical dose.^[22] Table 4 shows the recoveries obtained, and all of them were close to 100%, despite the presence of a very complex matrix.

CONCLUSIONS

A simple, rapid, low-cost, and selective multicommutated CL sensor is described for the determination of CFD in pharmaceutical preparations and human urine. The method is based on the direct oxidation of CFD by permanganate, a reaction that is produced on the anionic solid support Sephadex-QAE A-25.

These microbeads enable obtaining the required selectivity and sensitivity, thereby avoiding the use of additional enhancing reagents. On the other hand, the employment of the multicommutation principles permits one to automate the system and obtain a high sample throughput, which makes the proposed method suitable for the routine analysis of CFD in pharmaceutical preparations. Hence, the method has proved to be useful for quality control of CFD in drug industries.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to the Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa (Junta de Andalucía), Project P07-FQM-02673, for financial support. L. Molina-García also acknowledges a grant from University of Jaén.

REFERENCES

- Makchit, J.; Upalee, S.; Thongpoon, C.; Liawruangrath, B.; Liawruangrath, S. Determination of cefadroxil by sequential injection with spectrophotometric detector. *Anal. Sci.* **2006**, *22*(4), 591–597.
- El-Gindy, A.; ElWailly, A. F. M.; Bedair, M. F. First-derivative spectrophotometric and LC determination of cefuroxime and cefadroxil in urine. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2000**, *23*(2–3), 341–352.
- Samanidou, V. F.; Ioannou, A. S.; Papadoyannis, I. N. The use of a monolithic column to improve the simultaneous determination of four cephalosporin antibiotics in pharmaceuticals and body fluids by HPLC after solid phase extraction: A comparison with a conventional reversed-phase silica-based column. *J. Chromatogr. B* **2004**, *809*(1), 175–182.
- Ozkan, S. A.; Erk, N.; Uslu, B.; Yilmaz, N.; Biryol, I. Study on electrooxidation of cefadroxil monohydrate and its determination by differential pulse voltammetry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2000**, *23*(2–3), 263–273.
- Saleh, G. A.; Askal, H. F.; Radwan, M. F.; Omar, M. A. Use of charge-transfer complexation in the spectrophotometric analysis of certain cephalosporins. *Talanta* **2001**, *54*(6), 1205–1215.
- El Wailly, A. F. M.; Gazy, A. A. K.; Belal, S. F.; Khamis, E. F. Use of cerium (IV) in the spectrophotometric and spectrofluorimetric determinations of penicillins and cephalosporins in their pharmaceutical preparations. *Spectrosc. Lett.* **2000**, *33*(6), 931–948.
- Salem, H. Selective spectrophotometric determination of phenolic β -lactam antibiotics in pure forms and in their pharmaceutical formulations. *Anal. Chim. Acta* **2004**, *515*(2), 333–341.
- El Wailly, A. F. M.; Abdel-Kader Gazy, A.; Belal, S. F.; Khamis, E. F. Selective spectrofluorimetric determination of phenolic β -lactam antibiotics through the formation of their coumarin derivatives. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1999**, *20*(4), 643–653.
- Hefnawy, M.; El-Shabrawy, Y.; Belal, F. Spectrofluorometric determination of alpha-aminoccephalosporins in biological fluids and pharmaceutical preparations. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1999**, *21*(4), 703–707.
- Aly, F. A.; Alarfajj, N. A.; Alwarthan, A. A. Permanganate-based chemiluminescence analysis of cefadroxil monohydrate in pharmaceutical samples and biological fluids using flow injection. *Talanta* **1998**, *47*(2), 471–478.
- Sun, Y.; Tang, Y.; Yao, H.; Zheng, X. Potassium permanganate-glyoxal chemiluminescence system for flow injection analysis of cephalosporin antibiotics: Cefalexin, cefadroxil, and cefazolin sodium in pharmaceutical preparations. *Talanta* **2004**, *64*(1), 156–159.
- Thongpoon, C.; Liawruangrath, B.; Liawruangrath, S.; Wheatley, R. A.; Townshend, A. Flow injection chemiluminescence determination of cephalosporins in pharmaceutical preparations using tris (2,2'-bipyridyl) ruthenium (II)-potassium permanganate system. *Anal. Chim. Acta* **2005**, *553*(1–2), 123–133.
- Li, Y.; Lu, J. Chemiluminescence flow-injection analysis of β -lactam antibiotics using the luminol-permanganate reaction. *Luminescence* **2006**, *21*(4), 251–255.
- Mervartová, K.; Polásek, M.; Calatayud, J. M. Recent applications of flow-injection and sequential-injection analysis techniques to chemiluminescence determination of pharmaceuticals. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2007**, *45*(3), 367–381.
- Miró, M.; Estela, J. M.; Cerdà, V. Potentials of multisyringe flow injection analysis for chemiluminescence detection. *Anal. Chim. Acta* **2005**, *541*(1–2), 55–66.
- Rocha, F. R. P.; Reis, B. F.; Zagatto, E. A. G.; Lima, J. L. F. C.; Lapa, R. A. S.; Santos, J. L. M. Multicommutation in flow analysis: Concepts, applications and trends. *Anal. Chim. Acta* **2002**, *468*(1), 119–131.
- Ruedas-Rama, M. J.; Ruiz-Medina, A.; Molina-Díaz, A. A simple and straightforward procedure for monitoring phenol compounds in waters by using UV solid phase transduction integrated in a continuous flow system. *Microchim. Acta* **2003**, *141*(3–4), 143–148.
- Adcock, J. L.; Francis, P. S.; Barnett, N. W. Acidic potassium permanganate as a chemiluminescence reagent: A review. *Anal. Chim. Acta* **2007**, *601*(1), 36–67.
- Catalá-Icardo, M.; García-Mateo, J. V.; Martínez-Calatayud, J. Multicommutation as a powerful new analytical tool. *Trends Anal. Chem.* **2002**, *21*(5), 366–378.
- Llorent-Martínez, E. J.; Ortega-Barrales, P.; Molina-Díaz, A. Multi-commutated flow-through multi-optosensing: A tool for environmental analysis. *Spectrosc. Lett.* **2006**, *39*(6), 619–629.
- MacDougall, D.; Crummett, W. B. Guidelines for data acquisition and data quality evaluation in environmental chemistry. *Anal. Chem.* **1980**, *52*(14), 2242–2249.
- CGCOF. *Catálogo de Medicamentos*; Madrid, Spain, 2007.

**Sensitive determination of indomethacin in
pharmaceuticals and urine by sequential injection
analysis and optosensing**

Journal AOAC International 93 (2010) 1443-1449

DRUG FORMULATIONS AND CLINICAL METHODS

Sensitive Determination of Indomethacin in Pharmaceuticals and Urine by Sequential Injection Analysis and Optosensing

LUCÍA MOLINA-GARCÍA, M. LUISA FERNÁNDEZ-DE CÓRDOVA, and ANTONIO RUIZ-MEDINA¹

University of Jaén, Faculty of Experimental Sciences, Department of Physical and Analytical Chemistry, Campus Las Lagunillas, E-23071 Jaén, Spain

A selective and sensitive method based on coupling of sequential injection analysis (SIA) and optosensing was developed and applied to the determination of indomethacin in pharmaceutical and urinary samples. After alkaline hydrolysis, the fluorescent product generated from indomethacin is inserted in the flow system, transiently retained on an active solid support (Sephadex QAE A-25) filling the flowcell, and monitored at 283/371 nm ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$). The system was calibrated for two sample volumes, 100 and 1000 μL . It showed a linear dynamic range of 0.5–6.5 ng/mL, with an LOD of 0.15 ng/mL and an RSD of 3.9% ($n = 10$) when the highest sample volume was used. The proposed fluorometric SIA optosensor was applied to the determination of indomethacin in both pharmaceuticals and urine samples, and satisfactory results were obtained.

Indomethacin (INM), 1-(*p*-chlorobenzoyl)-5-methoxy-2-methyl-3-indolylacetic acid, is a traditional nonsteroidal anti-inflammatory drug with analgesic and antipyretic activity comparable to that of salicylate, extensively used in the treatment of rheumatic diseases. It is broadly used for relief of acute joint and backbone pain, and the treatment of degenerative diseases of joints and ligaments, such as rheumatoid arthritis, osteoarthritis, and ankylosing spondylitis (1). Oral administration of INM may cause severe side effects, including irritation of the stomach, and its use is often associated with adverse effects in the central nervous system, such as dizziness, vertigo, headache, agitation, psychosis, and depression (2).

A number of papers have been published concerning the determination of INM in different matrixes of pharmaceutical or biomedical interest. Among them, separation methods, such as GC (3, 4), HPLC (5–8), and capillary zone electrophoresis (9, 10), have been developed. Electroanalytical techniques, such as adsorptive stripping voltammetry (11, 12) and potentiometry (13), have also been used. With respect to spectroscopic methods, derivative UV

spectrophotometric (14), spectrophotometric with molybdate as a color-forming reagent (15), fluorometric (16, 17), and chemiluminescent (18) methods have been devised previously for the determination of this drug.

In general, the limitation of the spectroscopic methods is their difficult applicability to complex matrixes, such as biological samples. Solid-phase spectrometry (SPS) could be used as an alternative in order to avoid this problem. SPS is based on the direct measurement of the degree of light absorption or emission shown by an active solid support on which the analyte or its derivative compound has been retained, thereby achieving an important improvement with respect to conventional solution spectrometry in both sensitivity and selectivity (19). When SPS is used, separation and preconcentration of the species measured can be carried out manually (batch methodology). Nevertheless, it is time-consuming and laborious, might cause sample contamination, and can give rise to large sample/reagent consumption (20). It is more beneficial to perform such an operation online, which not only eliminates the drawbacks of a batch procedure but, at the same time, results in improved precision and reduced waste production. Beads of an active surface (solid support) can be placed into an appropriate flowcell to obtain a continuous sensing device that allows online species monitoring. The solid support has to be regenerated after measurements to make the sensing system reusable. In these systems, called flow-through optosensors, separation and preconcentration steps occur simultaneously with the detection step. The potential of these systems in biological analysis has been demonstrated (21).

The implementation of sequential injection analysis (SIA; 22, 23) in flow-through optosensors adds advantages, such as a complete automation of the system (24, 25). In this paper, a straightforward fluorometric SIA-SPS system is reported for the determination of INM. A strongly fluorescent product generated by the alkaline hydrolysis of the drug is retained on Sephadex QAE A-25 (Aldrich, Madrid, Spain) in the detection area and monitored. The sensing solid microzone works in a simple, inexpensive, reusable, and rapid way, providing a highly sensitive and reproducible flow-through optosensor. The retention of the monitored species on the solid support provides the rigidity required to enhance the luminescence intensity of the system, avoiding the use of surfactants commonly used in homogeneous

Received April 13, 2009. Accepted by SW July 24, 2009.

¹ Corresponding author's e-mail: anruiz@ujaen.es

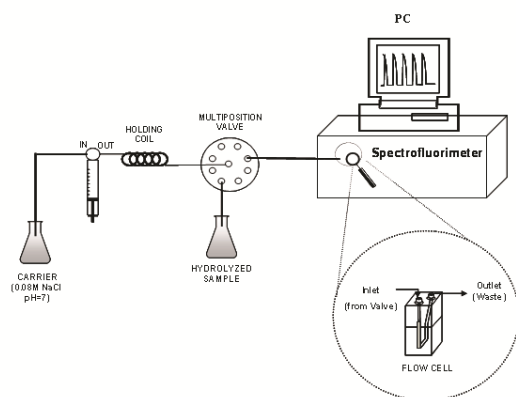


Figure 1. Diagram of the SIA-SPS system.

solution. The system has been applied to the determination of INM in pharmaceutical preparations and human urine samples.

Experimental

Chemicals

All experiments were performed with reagents of analytical grade, HPLC grade solvents (Panreac, Barcelona, Spain), and deionized water (used for the dilution of samples and reagents).

INM was obtained from Sigma (Alcobendas, Madrid, Spain). INM stock solution of 200 mg/L was prepared by dissolving the required weight in water-methanol (60 + 40, v/v). It was kept in the dark under refrigeration at 4°C and remained stable for at least 3 months. INM working solutions were prepared by appropriate dilution of the stock solution with deionized water.

NaOH, HCl, NaCl, KCl, NaNO₃, Na₂CO₃, and acetonitrile were obtained from Panreac. 1 M NaOH and 0.5 M NaCl stock solutions were prepared in deionized water. Required working solutions were prepared daily by suitable dilution in deionized water.

Carrier solution was prepared by dissolving the appropriate amount of NaCl in distilled water and adding the necessary volume of 0.1 M NaOH solution to adjust the pH to 7.0.

C₁₈ bonded-phase silica gel beads (Waters, Milford, MA; 55–105 µm average particle size) and Sephadex QAE A-25 and DEAE A-25 anion exchanger gels in the chloride form (Aldrich, Madrid, Spain; 40–125 µm average particle size) were tested as sensing supports.

Instrumentation

Fluorescence emission measurements were performed with a Cary-Eclipse luminescence spectrometer (Varian Inc., Mulgrave, Australia) controlled by a computer equipped with a Cary-Eclipse (Varian) software package for data collection

and treatment. The spectrofluorometer was equipped with a xenon discharge lamp (75 kV), Czerny-Turner monochromators, two detectors (sample and internal reference), and an R-928 photomultiplier tube (red-sensitive, maximum $\lambda = 900$ nm) by automatic control (Hamamatsu Corp., Bridgewater, NJ). Instrument excitation and emission slit widths were set at 10 and 20 nm, respectively. The detector voltage was 650 or 625 V, depending on the sample volume used (100 or 1000 µL, respectively).

The SIA system (Figure 1) was composed of a Cavro XP 3000 pump (Cavro Scientific Instruments, Sunnyvale, CA) equipped with a 5 mL syringe and Valco Instruments Co. Inc. (Houston, TX) 10-port selection valve. PTFE tubing of 0.8 mm id was used in the manifold; the same tubing was used for the 2 mL holding coil. The system was computer controlled using a home-written software program (Sagittarius Version 3.0.25) based on MS Visual Basic 6.0 (Microsoft Corp., Redmond, WA).

A Hellma GmbH & Co., KG (Müllheim, Germany) flowcell 176.752-QS (25 µL inner volume; 1.5 mm light path length) filled with Sephadex QAE A-25 was used in the detector. The cell was blocked in the outlet with glass wool to prevent displacement of the resin particles. The cell was filled with an aqueous slurry of the solid support just up to a height that enabled the light beam to pass completely through the solid phase. Higher levels would cause analyte preconcentration on the upper part of the solid support, above the excitation light beam in the detection area, resulting in a signal decrease. Lower levels would also cause the signal to decrease due to the light beam passing partially or completely through the flowing solution.

Other apparatus consisted of a Crison (Barcelona, Spain) Model 2002 pH meter with a glass/saturated calomel combination electrode, a Selecta Ultrasons ultrasonic bath (Barcelona, Spain), and a Selecta centrifuge S-240.

Preparation of Samples

(a) *Pharmaceuticals*.—The pharmaceutical preparations analyzed were capsules in all cases (three different preparations). Ten capsules of each pharmaceutical were ground and homogenized; a sample solution was prepared by dissolving an appropriate amount of the powder in methanol-water (60 + 40, v/v). The solution obtained was filtered through a 0.45 µm membrane filter (Millipore Corp., Billerica, MA) in order to eliminate the remaining insoluble matter. Finally, the filtered solution was made up to volume (100 mL) with NaOH solution to obtain a final NaOH concentration of 0.01 M.

(b) *Urine*.—INM-free human urine samples were kindly supplied by healthy volunteers. An appropriate aliquot of INM stock solution and 2 mL acetonitrile were added to a 4 mL urine sample. The solution was blended on a vortex mixer and centrifuged at 4000 rpm for 15 min. This solution was filtered through a 0.45 µm membrane filter (Millipore) and diluted to volume (100 mL) with NaOH solution to obtain a final NaOH concentration of 0.01 M.

Procedures

(a) *Hydrolysis of INM.*—An appropriate amount of NaOH solution was added to the working INM solution to obtain a final 0.01 M NaOH concentration.

(b) *Conditioning of the SLA-SPS system.*—When the solid support Sephadex QAE A-25 was introduced the first time into the flowcell, 3000 μL 0.08 M NaCl (pH 7.0) was aspirated into the holding coil, at a flow rate of 5 mL/min from a reservoir, and passed through the sensing zone in order to condition it. Every time the sample was changed, 500 μL sample solution was aspirated (5 mL/min), introduced into the system, and eliminated with the waste. In this way, the portion of tubing filled with the previous sample was cleaned with the new one, thereby avoiding contamination between samples.

(c) *Pharmaceutical and urine samples.*—2800 μL carrier solution and 100 μL (pharmaceuticals) or 1000 μL (urine) sample solution were sequentially aspirated into the syringe pump at a flow rate of 5 mL/min. Then, the mixture was pumped at a rate of 1.5 mL/min towards the flowcell, where the fluorescent INM product was transiently retained and monitored at 283/371 nm ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$). The carrier solution eluted the INM product, thereby regenerating the sensing zone for measurement of a new sample.

Results and Discussion

Spectral Characteristics and Selection of the Solid Support

INM does not exhibit native fluorescence and is relatively stable at neutral pH, but it is rapidly hydrolyzed in alkaline medium due to the OH^- -reactive amide bond. This derivative reaction permits its fluorometric determination by monitoring the formed fluorescent compound (26). Two different anion-exchangers on dextran (Sephadex QAE A-25 and Sephadex DEAE A-25) and a nonpolar sorbent (octadecyl silane C_{18}) were tested in order to retain this compound on a solid support. It was observed that it was retained on both Sephadex QAE A-25 and silica gel C_{18} . However, the highest analytical signal was obtained by using Sephadex QAE A-25. The sorption of the INM hydrolysis product on this solid support avoided the use of an additional eluting solution, because the carrier solution itself completely regenerated the sensing zone. Therefore, this anion exchanger was selected for the retention of the monitored species. The level of the resin packed in the flowcell had to be carefully adjusted in order to ensure that the upper part was just above the light path, so as to obtain the best sensitivity.

The fluorescence spectra of the hydrolyzed analyte in aqueous solution showed maximum excitation and emission wavelengths at 283 and 371 nm, respectively. When the spectra on Sephadex QAE A-25 were recorded, no significant difference was observed in these wavelengths with respect to those obtained in homogeneous solution. Nevertheless, as a result of the retention of the fluorescent product on the solid support, the obtained signal was 25 times higher than that obtained in aqueous solution, which can be attributed to its

preconcentration on the active solid support in the detection area of the spectrofluorometer.

Instrumental Variables

The influence of both the excitation and emission slit widths on the measurements, in the range of 5–20 nm, and the effect of the photomultiplier tube detector voltage, in the range 425–700 V, were studied. Increasing slit widths or voltage resulted in increasing fluorescence signals of both the hydrolyzed analyte and the baseline (background signal of the solid support). Slit widths of 10 and 20 nm for excitation and emission, respectively, and a voltage value of 650 (100 μL) or 625 V (1000 μL), depending on the sample volume, were adopted as a compromise between sensitivity and low baseline. Higher baseline values would not allow the determination of INM because the measurement range would be too narrow.

Chemical Variables

Selection of the carrier/eluting solution.—The nature and pH of the carrier solution were studied in order to obtain the highest sensitivity. First, we checked that the use of water as a carrier solution caused a strong retention of the monitored species in the upper part of the solid support, out of the irradiated area. However, the addition of an electrolyte to the carrier solution provided an important improvement in the fluorescent signal, due to the displacement of the fluorescent compound to the zone irradiated by the light beam. In addition, the retention of the fluorescent compound on the solid support was transitory. Of all the electrolytes tested (NaCl, KCl, NaNO_3 , and Na_2CO_3), NaCl provided the best results. Several NaCl concentrations were tested (0.01–0.5 M), and a practically constant analytical signal was obtained for all of them. However, the regeneration of the solid support for NaCl concentrations lower than 0.08 M was not complete. Finally, this NaCl concentration was chosen for the next assays.

The influence of the pH of the 0.08 M NaCl carrier solution on the fluorescence intensity was investigated in the range of 3–12. These pH values were adjusted with NaOH or HCl. The best analytical signal was obtained in the range of 6–7, specifically pH 7.0; therefore, this value was selected (Figure 2). $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ buffer solution was tested in order to adjust the pH of the carrier solution to 7.0, but no improvement in the analytical signal was obtained compared with that obtained in the previous test. Therefore, the carrier solution consisted of 0.08 M NaCl (pH 7.0). This carrier solution allowed the elution of the fluorescent compound and the complete regeneration of the solid support, thereby avoiding use of an additional eluting solution.

Hydrolysis conditions.—As previously reported, INM can be quickly hydrolyzed in alkaline medium (26). The optimum reaction conditions were established by studying the influence of NaOH concentration, time of hydrolysis, and temperature. For the study of each variable, all others were maintained constant and only the one under study was changed. The study was carried out for a 150 ng/mL INM solution.

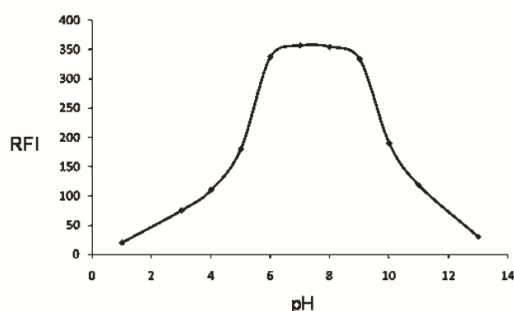


Figure 2. Study of the influence of the pH of the carrier solution [INM= 120 ng/mL, 100 μ L sample volume and relative fluorescence intensity (RFI)].

The influence of NaOH concentration was tested in the range of 5×10^{-3} to 0.15 M. It was found that the maximum fluorescence intensity occurred at a 0.01 M NaOH concentration. Higher values than 0.01 M caused a decrease in the analytical signal, probably due to the competition of the ions of NaOH with the fluorescent INM product for the active sites of the solid support. The analytical signal also decreased for NaOH concentrations lower than 0.01 M, which can be attributed to an incomplete hydrolysis of INM. Hence, a 0.01 M NaOH concentration was considered to be the most appropriate for the hydrolysis of the drug.

The time of hydrolysis was investigated in the range of 0.5–5 min. A minimum time of 1 min was necessary to get the maximum fluorescence intensity. The temperature of the hydrolysis reaction was tested in the range of 20–100°C, and no significant differences in the analytical signal were obtained.

We concluded that hydrolysis of INM is practically instantaneous and can be carried out at room temperature. We

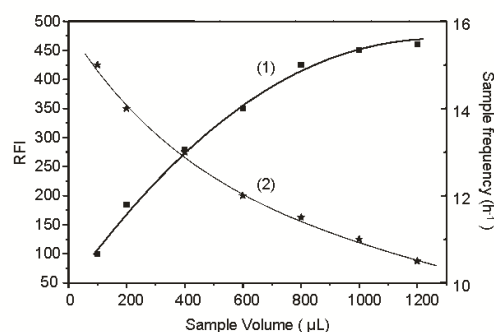


Figure 3. Study of the influence of the sample volume on (1) the analytical signal, and (2) the sample frequency.

also found that hydrolysis cannot be carried out online using reactors with different lengths due to incomplete mixing between INM and NaOH solutions. Nevertheless, hydrolysis in the batch mode did not cause any additional time of analysis.

SIA Variables

Other important parameters affecting the magnitude of the analytical signal were the volumes of the sample and carrier solutions, and the effect of the flow rate.

Volumes of the sample and carrier solutions.—The study of the influence of the volume of sample was carried out with a 5 ng/mL INM solution in the range of 100–1200 μ L. As usual in flow-through optosensors, an increase in the volume of sample inserted in the system caused an increase in the analytical signal due to the sorption of an increasing amount of the fluorescent INM product on the same amount of solid support. The analytical signal increased up to a 1000 μ L

Table 1. Analytical parameters

Parameter	Sample volume, μ L	
	100	1000
Excitation/emission slit size, nm/nm	10/20	10/20
Photomultiplier tube voltage, V	650	625
Linear dynamic range, ng/mL	5–150	0.55–6.5
Calibration graph		
Intercept \pm SD	9.927 \pm 0.302	2.048 \pm 0.103
Slope \pm SD, mL/ng	2.870 \pm 0.004	99.606 \pm 0.090
Correlation coefficient	0.9959	0.9986
LOD, ng/mL	1.5	0.15
LOQ, ng/mL	5	0.5
RSD, % ($n = 10$)	2.1	3.9
Sampling frequency, samples/h	14	11

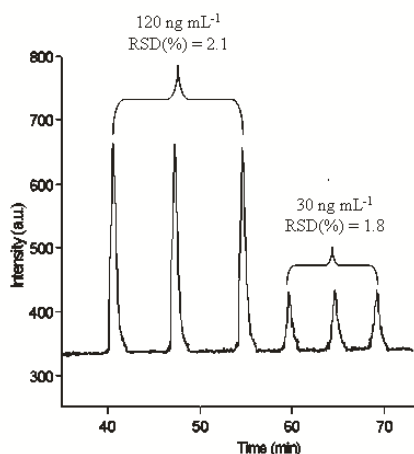


Figure 4. Diagram obtained for the proposed sensor (100 μL sample volume).

volume and remained constant above this value. Nevertheless, this improvement in sensitivity also implies a decrease in throughput and, consequently, a compromise in both effects had to be made (Figure 3). Finally, 100 and 1000 μL were the volumes of sample selected for the analysis of pharmaceuticals (lower sensitivity and higher sample frequency) and urine (higher sensitivity and lower sample frequency), respectively.

The optimum volume of carrier solution was also studied. The chosen volume was the lowest one that provided the complete regeneration of the solid support and the restoration of the baseline after each sample insertion, 2800 μL .

Flow rate.—The flow rate was investigated from 0.5 to 1.5 mL/min. Flow rates above 1.5 mL/min caused overpressure problems in the flow system. An increase in the flow rate gave a slight decrease in the fluorescence intensity. Therefore, a compromise between the sensitivity and time involved in the analysis had to be made. Finally, a 1.5 mL/min flow rate was chosen for measurements. The flow rate used for the aspiration of solutions into the syringe pump and holding coil was 5 mL/min.

Figures of Merit

Considering the optimized working conditions, the analytical parameters of the system were studied for two different sample volumes, 100 and 1000 μL . Table 1 contains the figures of merit of the proposed method for the determination of INM. The methodology was able to produce analytical fits with good linearity in the ranges of 5–150 and 0.5–6.5 ng/mL for volumes of 100 and 1000 μL , respectively. Data were fitted by standard least-squares calibration. Figure 4 shows a typical diagram obtained for two different INM concentrations. The repeatability was established for 10 independent analyses of sample solutions, and RSD

values lower than 4% for both calibration volumes were obtained. The LOD and LOQ values were estimated as the concentration of analyte that produced an analytical signal equal to three and ten times, respectively, the SD of the background fluorescence (27, 28). An LOD as low as 0.15 ng/mL (for a 1000 μL sample volume) was obtained, making the method proposed highly sensitive. This LOD is lower than that reported in the literature for spectroscopic (14–18), electrochemical (11–13), and chromatographic (3, 5–8) methods, which are in the order of ng/mL or $\mu\text{g/mL}$.

Interference Study

In order to determine the effect of possible interferences, a tolerance study was carried out with those organic and inorganic compounds that are usually found along with INM in both pharmaceutical and urine samples. This study was performed by adding different amounts of the possible interfering species to a solution containing 70 ng/mL INM (100 μL sample volume). The interference-to-analyte ratio chosen for this study was much higher than that usually found in real samples. A foreign species was considered not to interfere if it produced an error smaller than $\pm 2\sigma$ in the analytical signal. If any interference was observed, the ratio interfering species/analyte (w/w) was reduced progressively until this interference ceased. The results are shown in Table 2. In general, these results show that the proposed method is highly selective due to the retention of the hydrolyzed analyte on the solid support and its consequent separation from the matrix and the rest of the molecules, anions, and cations.

Some ions, such as Fe(III) and Cu(II), were the most serious interferences. Although the tolerance levels of both metals were enough for determining INM in urine, they can be easily increased 20 times by adding to the carrier solution an appropriate concentration of EDTA (2.68×10^{-4} M).

Table 2. Effect of foreign species

Foreign species	Tolerated interferent/analyte ratio, w/w ^a
Lactose, saccharose, glucose, starch, Na^+ , K^+ , Cl^- , I^- , SO_4^{2-} , uric acid, creatinine	>500 ^b
Ca^{2+}	350
NO_3^-	80
Urea	45
CO_3^{2-}	40
Mg^{2+}	30
PO_4^{3-}	20
Cu^{2+}	6
Fe^{3+}	3

^a For 70 ng/mL INM solution.

^b Maximum ratio tested.

Table 3. Recovery study in urine

Sample	Spiked, ng/mL	Found, ng/mL	Recovery, % ± RSD, % ^a
Urine-1	2	2.1	105 ± 1
	10	10.5	105 ± 3
	15	14.8	99 ± 2
Urine-2	25	24.6	98 ± 2
	40	42.8	107 ± 2
	50	52.0	104 ± 1
Urine-3	60	61.8	103 ± 3
	80	77.9	97 ± 1
	100	106.0	106 ± 2

^a Means of three determinations; standard addition method.

Analytical Applications

The proposed method was applied to the determination of INM in three different urine samples by performing a recovery study at three INM concentration levels. It was necessary to apply the standard addition method due to the matrix effect found. Urine samples were prepared as described above under *Preparation of Samples* and spiked with known amounts of the analyte (ranging from 2 to 100 ng/mL). These INM amounts were those usually found after administration of a pharmaceutical dose. Satisfactory recoveries were obtained in all cases (Table 3), demonstrating the applicability of the proposed method to the determination of INM in these biological samples. With the purpose of comparing the results obtained with the proposed method to those obtained with a reference method (29), an INM-free urine sample was spiked with 15, 50, and 100 ng/mL INM. The recoveries obtained (mean, % ± RSD, %, $n = 3$) were 100.2 ± 1.8 and 97.6 ± 2.3 (15 ng/mL), 103.1 ± 2.3 and 97.5 ± 3.0 (50 ng/mL), and 99.5 ± 1.6 and 98.5 ± 2.2 (100 ng/mL) for the proposed and reference methods, respectively. A statistical comparison between the results of both methods by Student's *t*-test ($P = 0.05$) demonstrated that there was no significant difference between them, proving the applicability of the proposed method for the determination of INM in urine samples.

The proposed method was also applied to the analysis of different pharmaceuticals listed in the *Spanish Pharmacopoeia*. After preparation of the samples, the INM concentration was determined by applying the proposed procedure. In each case, the INM concentration determined was in agreement with the value provided by the manufacturer. In addition, a recovery study was performed by adding three different amounts of INM to each pharmaceutical. The results obtained are shown in Table 4, with good recoveries ranging from 94 to 104% and RSDs lower than 2.2%.

Table 4. Determination and recovery study in pharmaceutical preparations

Pharmaceutical	Added, µg/mL	Recovery, % ± RSD, % ^a
Inacid (Merck Sharp Dohme) ^b	—	101 ± 1
	10	94 ± 1
	20	100 ± 2
	40	104 ± 2
Flogoter (Estedi) ^b	—	102 ± 1
	60	97 ± 2
	80	102 ± 1
Indonilo (Sigma TAU) ^c	100	101 ± 1
	—	99 ± 1
	50	98 ± 2
	75	103 ± 2
	100	100 ± 1

^a Means of three determinations.

^b 25 mg/capsule.

^c 50 mg/capsule.

Conclusions

The suitability of the proposed optosensor for the determination of INM has been demonstrated. The method is based on the measurement of the fluorescence emitted by its hydrolysis product. The implementation of SIA provides the complete automation of the system, which is an interesting characteristic taking into account the possibility of applying the method proposed to routine INM analysis. The use of a solid support into the flowcell allows the required selectivity, as well as a high sensitivity, compared with other methodologies previously described for the determination of INM. The method proposed is suitable for the analysis of INM not only in pharmaceuticals, but also in human urine at levels usually found in patients after administration. Hence, the method could be useful for easy, rapid, selective, and highly sensitive analysis of INM using a low-cost analytical instrumentation.

Acknowledgments

We are grateful to the Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa (Junta de Andalucía), Project P07-FQM-02673, for financial support. L. Molina-García also acknowledges a grant from the University of Jaén.

References

- (1) Czech drug database, AISLP-Automated information system of pharmaceuticals preparations (2009) <http://www.aislp.cz/en>, accessed May 3

- (2) Clunie, M., Crone, L.A., Klassen, L., & Yip, R. (2003) *Can. J. Anaesth.* **50**, 586 588
- (3) Nishioka, R., Harimoto, T., Umeda, I., Yamamoto, S., & Oi, N. (1990) *J. Chromatogr.* **526**, 210 214
- (4) Dawson, M., Smith, M.D., & McGee, C.M. (1991) *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* **19**, 453 458
- (5) Al Za'abi, M.A., Dehghanzadeh, G.H., Norris, R.L.G., & Charles, B.G. (2006) *J. Chromatogr. B* **830**, 364 367
- (6) Grippa, E., Santini, L., Castellano, G., Gatto, M.T., Leone, M.G., & Saso, L. (2000) *J. Chromatogr. B* **738**, 17 25
- (7) Löffler, D., & Ternes, T.A. (2003) *J. Chromatogr. A* **1021**, 133 144
- (8) Bayne, W.F., East, T., & Dye, D. (1981) *J. Pharm. Sci.* **70**, 458 459
- (9) Chen, Y.L., & Wu, S.M. (2005) *Anal. Bioanal. Chem.* **381**, 907 912
- (10) Makino, K., Yano, T., Maiguma, T., Teshima, D., Sando, T., Itoh, Y., & Oishi, R. (2003) *Ther. Drug Monit.* **25**, 574 580
- (11) Reguera, C., Arcos, M.J., & Ortiz, M.C. (1998) *Talanta* **46**, 1493 1505
- (12) Solich, P., Sklenářová, H., Huclová, J., Šatinský, D., & Schaefer, U.F. (2003) *Anal. Chim. Acta* **499**, 9 16
- (13) Aubeck, R., Brauchle, C., & Hampp, N. (1991) *Analyst* **116**, 811 814
- (14) Stolarczyk, M., Krzek, J., & Rzeszutko, W. (2004) *J. AOAC Int.* **87**, 592 595
- (15) Aman, T., Naureen, F., Kazi, A.A., Khan, I.U., & Kashmiri, M.A. (2002) *Anal. Lett.* **35**, 1007 1020
- (16) Pinto, P.C.A.G., Saraiva, M.L.M.F.S., Santos, J.L.M., & Lima, J.L.F.C. (2005) *Anal. Chim. Acta* **539**, 173 179
- (17) Sastry, C.S.P., Mangala, D.S., & Ekambareswara, R.K. (1986) *Analyst* **111**, 323 325
- (18) Mervartová, K., Polásek, M., & Catalayud, J.M. (2007) *Anal. Chim. Acta* **600**, 114 121
- (19) Capitán-Vallvey, L.F., Navas-Iglesias, N., De Orbe Payá, I., & Avidad Castañeda, R. (1996) *Talanta* **43**, 1457 1463
- (20) Ortega Barrales, P., Fernández de Córdova, M.L., & Molina Díaz, A. (1998) *Anal. Chem.* **70**, 271 275
- (21) López-Flores, J., Fernández-de Córdova, M.L., & Molina-Díaz, A. (2007) *Anal. Bioanal. Chem.* **388**, 1771 1777
- (22) Kulka, S., Quintás, G., & Lendl, B. (2006) *Analyst* **131**, 739 744
- (23) Idris, A.M., & Alnajjar, A.O. (2008) *Talanta* **77**, 522 526
- (24) Llorent-Martínez, E.J., Šatinský, D., & Solich, P. (2007) *Anal. Bioanal. Chem.* **387**, 2065 2069
- (25) Llorent-Martínez, E.J., Domínguez-Vidal, A., Ortega-Barrales, P., De la Guardia, M., & Molina-Díaz, A. (2005) *Anal. Chim. Acta* **545**, 113 118
- (26) Matos, C., Chaimovich, H., Lima, J.L.F.C., Cuccovia, I.M., & Reis, S. (2001) *J. Pharm. Sci.* **90**, 298 309
- (27) International Union of Pure and Applied Chemistry (1976) *Spectrochim. Acta B* **33**, 241 245
- (28) MacDougall, D. (1980) *Anal. Chem.* **52**, 2242 2249
- (29) Bakkali, A., Corta, E., Berrueta, L.A., Gallo, B., & Vicente, F. (1999) *J. Chromatogr. B* **729**, 139 145

**A novel multicommutated fluorimetric optosensor for
determination of resveratrol in beer**

Talanta 83 (2011) 850-856



Contents lists available at ScienceDirect

Talanta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/talanta

A novel multicommuted fluorimetric optosensor for determination of resveratrol in beer

Lucía Molina-García, Antonio Ruiz-Medina, María Luisa Fernández-de Córdoba*

Department of Physical and Analytical Chemistry, University of Jaén, Campus Las Lagunillas s/n, 23071 Jaén, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 June 2010

Received in revised form 10 October 2010

Accepted 26 October 2010

Available online 2 November 2010

Keywords:

Resveratrol

Multicommutation

Optosensor

Photochemically induced fluorescence

Beer

ABSTRACT

Resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) is a phytoalexin that plays a central role in the human diet because of its antioxidant, anticarcinogenic and antimutagenic properties. This paper shows the development of a multicommuted optosensing device for the determination of resveratrol in beer. The method is based on the measurement of the fluorescence (277/382 nm, $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$) of the photoproduct on-line generated by UV-irradiation of resveratrol. The fluorescent photoproduct is monitored once it is retained on a solid support (Sephadex QAE A-25) in the detection area, which improves both sensitivity and selectivity. The sample was delipidated with toluene and cyclohexane and resveratrol was extracted by solid-phase extraction (SPE) on C_{18} cartridges, using methanol as eluent. This pre-treatment allowed recovering about an 82% resveratrol and removing its 3-O- β -D-glycoside (piceid) and other interfering substances present in beer. The method provides a detection limit (DL) of 1.0 ng mL^{-1} and a linear dynamic range (LDR) of $3.3\text{--}100 \text{ ng mL}^{-1}$. It was satisfactorily applied to the determination of resveratrol in top- and bottom-fermented beers by standard addition calibration. Resveratrol concentrations in the analysed samples varied from 4.1 to 14.1 ng mL^{-1} . This is the first proposed spectroscopic method for determination of resveratrol in beer.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Resveratrol, which occurs in two isomeric forms, *trans* and *cis* [1], is a naturally occurring polyphenolic compound belonging to stilbenoids family. In the last decade, this compound has attracted the attention of researchers due to their wide range of biological activities. Although both forms are naturally occurring, most of the recorded health benefits are attributed to the *trans* form. Stilbenoids are secondary products of heartwood formation in trees that can act as phytoalexins. Resveratrol has been shown to inhibit multistage carcinogenesis [2], and collected evidence suggests that it may exert a protective effect in central nervous system under pathological conditions, and is associated with reduced risks of cardiovascular disease, diabetes, and Alzheimer's disease [3–5]. Resveratrol is highly enriched in a variety of sources, such as grapes [6], red wine [7], peanuts [8] and pistachios [9]. Hop, used almost exclusively by brewers for bitterness, flavor and antimicrobial protection, was also recently reported as an interesting source of resveratrol, highlighting the potential health-promoting effect of moderate beer consumption [10,11].

Various techniques have been employed for the determination of resveratrol in liquid samples, such as wine or plasma:

capillary electrophoresis [12,13], gas chromatography (GC) [14] and GC–mass spectrometry (GC–MS) [15,16], with previous derivatization, the most commonly utilised technique being high-performance liquid chromatography (HPLC, normally in reverse phase), with either diode-array [17], electrochemical [18], chemiluminescent [19], fluorimetric detection [20–22] or with mass spectrometry [23,24]. In addition, one spectroscopic method, based on photochemically induced second-derivative fluorescence (PIF), has been reported for the resveratrol analysis, which was applied to its determination in wine [25].

The preparation techniques used in resveratrol analysis in liquid samples are usually liquid–liquid extraction [25,26], solid-phase extraction (SPE) [26–28], and solid-phase microextraction (SPME) [29]. In some cases, a preliminary removal of hydrophobic constituents is also necessary to improve extraction recovery [26].

On the other hand, to date, only two chromatographic methods (HPLC–MS/MS and GC–MS) have been proposed for resveratrol analysis in beer, being the concentrations found in real samples, however, just below the quantification limits [26]. Therefore, the determination of resveratrol in this matrix makes necessary the development of very sensitive analytical methods.

The present paper was focused to develop a sensitive automatic fluorimetric method as an alternative to the chromatographic determination of resveratrol in beer. With this purpose, a procedure based on the measurement of the fluorescence of the photoproduct generated from resveratrol, by on-line UV-irradiation in a flow-

* Corresponding author. Fax: +34 953 212940.

E-mail address: mferna@ujaen.es (M.L. Fernández-de Córdoba).

system, was developed. The measurement of the analytical signal of the target compound retained on Sephadex QAE A-25, packed in the flow-cell placed in the detection area, was adopted for improving both detection limit and selectivity. This methodology, called flow injection-solid phase spectroscopy (FI-SPS) or flow-through optosensor, combines advantages of FI with the analyte preconcentration on a small amount of a solid support, such as high sensitivity and selectivity, rapidity, and simplicity [30]. Multicommutation principles [31–33] were also exploited in the flow-system with the purpose of allowing independent handling of sample and carrier solutions, low sample and reagent consumption and the complete automation of the process. SPE with sequential elution was used to selectively extract resveratrol and separate it from other interfering substances present in the beer. To the authors' knowledge, this is the first spectroscopic determination of resveratrol in beer to be reported. This is also the first application of multicommutation continuous-flow methodology to the determination of this stilbene. The proposed method was applied to the analysis of this compound in different kinds of commercial beers.

2. Experimental

2.1. Reagents and solutions

All reagents were analytical reagent grade, and Milli-Q (Millipore, Bedford, MA) water was used throughout.

trans-Resveratrol (Sigma, St. Louis, MO, USA) stock solution, 200 mg L⁻¹, was prepared by dissolving the appropriate amount in ethanol (Panreac, Barcelona, Spain). It was kept away from light with an aluminium foil and stored at 4 °C in a refrigerator, remaining stable for at least four weeks. Working standard solutions were prepared daily by taking an aliquot of the stock solution and diluting with 0.01 mol L⁻¹ NaCH₃COO/HCH₃COO (NaAc/HAc) buffer solution, pH 6.0. The working solutions were stable for at least 8 h, when protected from light, which was enough to make the daily experiments.

The carrier solution (0.05 mol L⁻¹ NaCl/0.001 mol L⁻¹ HNO₃ (pH 3.0)) was prepared by dissolving the required weight of NaCl in water and setting the pH to 3.0 with HNO₃ solution (both obtained of Panreac) with the aid of a pH-meter.

Sephadex QAE A-25 (40–120 μm average particle size) (Sigma, Alcobendas, Madrid, Spain) was used as active solid support in the detection area. Other cation and anion-exchangers (Sephadex SP C-25, Sephadex CM C-25 and Sephadex DEAE A-25, all of them having 40–120 μm average particle size) (Sigma) and C₁₈ bonded phase silica gel beads (55–105 μm average particle size) (Waters, Milford, MA, USA) were also tested for retention of the target compounds.

Methanol, ethanol, nitric acid, toluene and cyclohexane were obtained from Panreac. Octadecyl (C₁₈) Bakerbond SPE cartridges of 6 mL with 500 mg of packing material (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA) were also used.

2.2. Apparatus and instrumentation

The multicommutated flow system (Fig. 1) was built with a four channel Gilson Minipuls-3 (Villiers Le Bell, France) peristaltic pump fitted with a rate selector and pump tubing type Solvflex (Elkay Products, Shrewsbury, MA, USA), three 161T031 NResearch three-way solenoid valves (Neptune Research, MA, USA) and an electronic interface based on ULN 2803 integrate circuits. The valves were operated at an electric potential of 12 V and a direct current of 100 mA. PTFE tubing (0.8 mm i.d.) and methacrylate connections were also used. The software for controlling the system was developed in Visual Basic 6.0 by our research group. A 176.752-QS Hellma flow-cell (Müllheim, Baden, Germany) (inner volume, 25 μL; light

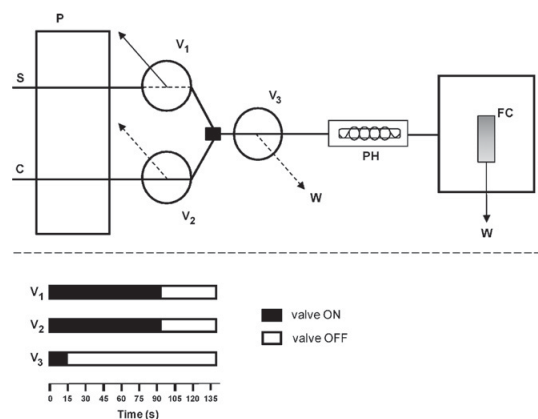


Fig. 1. Multicommutated flow-injection assembly. S, sample (buffered with 0.01 mol L⁻¹ NaAc/HAc buffer solution, pH 6.0); C, carrier solution (0.05 M NaCl/0.001 M HNO₃, pH 3.0); P, peristaltic pump; V₁, V₂, and V₃, three-ways solenoid valves; PH, photoreactor (110 cm length); F, spectrofluorimeter; FC, flow-cell (packed with Sephadex QAE A-25); W, waste. For each solenoid valve, the solid and dotted lines refer to "OFF" and "ON" positions, respectively. Flow-rate: 2.2 mL min⁻¹. The scheme below manifold shows the valve time program (sampling time, 80 s).

path length, 1.5 mm) was used in the detection area. It was filled with an aqueous slurry of the solid support (Sephadex QAE A-25) just up to a height which enabled the light beam to pass completely through the solid phase. The outlet was locked with glass wool to avoid the beads movement and allow the continuous flow.

For the on-line photochemical conversion of resveratrol, a home-made photoreactor was prepared by loosely coiling 110 cm of PTFE tubing (0.8 mm i.d., 1.6 mm o.d.) around a low-pressure mercury lamp, Philips TUV 15W FAM (15 W, 254 nm). The UV lamp was wrapped in aluminium paper and introduced into an aluminium box for maximum light reflection and heat dissipation. The photoreactor was placed just between V₃ and the detection area. All the experiments were carried out at room temperature.

Luminescence measurements and spectra recordings were performed with a Cary-Eclipse Luminescence Spectrometer (Varian Inc, Mulgrave, Australia), controlled by a computer equipped with a Cary-Eclipse (Varian) software package for data collection and treatment. Instrument excitation and emission slit widths were set at 20 and 20 nm, respectively, and the detector voltage was 590 V. The excitation and emission wavelengths were established at 277/382 nm, respectively.

UV-vis spectra were recorded with a Varian Cary 50 Spectrophotometer (Madrid, Spain) controlled by means of a PC fitted with the Varian computerized spectroscopy software, WIN-UV. A 100-QS Hellma cell with a light path length of 10 mm was employed for absorbance measurements.

Other apparatus consisted of a vacuum system 12-port Visiprep SPE Vacuum Manifold (Supelco, Bellefonte, PA), a Crison Model 2002 pH-meter with a glass/saturated calomel combination electrode (Crison, Barcelona, Spain) and a Selecta Ultrasons ultrasonic bath (Barcelona, Spain).

2.3. Sample preparation

The beer samples were purchased from local markets. Along all the process, the sample was kept away from the daylight, as far as possible, with the aid of aluminium foil.

Pre-cleaning to remove hydrophobic compounds. Aliquots of 25 mL of the samples were spiked with known amounts of *trans*-

resveratrol and then, they were treated under gentle stirring, in consecutive 3 min steps, first with 25 mL of toluene (three times) and then with 25 mL of cyclohexane (three times). At the end of each step, the mixture was centrifuged for 5 min at $4200 \times g$, and the supernatant was discarded. Finally, cleaned beer was dried under vacuum (30°C) to get rid of residual solvent.

Extraction of resveratrol. A C_{18} cartridge was conditioned by passing consecutively 3 mL of methanol and 6 mL of water. Subsequently, cleaned beer was passed through the cartridge at a flow-rate of $3\text{--}4\text{ mL min}^{-1}$ under vacuum. Then, the cartridge was washed firstly with 6 mL of water and secondly with 6 mL of 40% methanol:water (40:60, v/v). The elution of resveratrol retained in the cartridge was carried out with $3 \times 2\text{ mL}$ of methanol and the eluate was concentrated to dryness under a gentle stream of nitrogen. The final residue was solubilised in 10 mL of 0.01 mol L^{-1} NaAc/HAc buffer solution, pH 6.0.

2.4. Procedure

The schematic manifold is shown in Fig. 1. All experiments were carried out in triplicate and the results were expressed as peak-height mean values. The determination of resveratrol was carried out by following the next steps:

- In the initial status, being all the valves deactivated (solid lines), the peristaltic pump (P) and the UV lamp of the photoreactor (PH) were turned on to condition the flow-system until a stable baseline was recorded. Thus, the carrier solution (C) flowed through the system and the sample solution (S) was recycled to its vessel.
- Next, valves V_1 , V_2 and V_3 were activated (dashed lines) for 95, 95 and 15 s, respectively. Thus, the sample solution (S) circulated through the system, whereas the carrier solution (C) was recycled to its recipient. For the first 15 s of this step, the sample plug was directed towards the waste through V_3 , so cleaning the tubing between V_1 and V_3 with the new sample solution. Over the next 80 s, as V_3 was deactivated (solid line), the sample plug was pumped towards the detection area, passing through the photoreactor (PH). This originated the photochemical conversion of resveratrol into a fluorescent photoproduct.
- From 95 s, all the valves were deactivated and so, the sample solution (S) was recycled to its recipient, whereas the carrier solution (C) circulated again through the system, thus propelling the sample plug to the detector. When the fluorescent photoproduct of resveratrol reached the detection area, it was temporarily retained on the solid support and monitored ($277/382\text{ nm}$, $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$). The solid support was regenerated by the carrier solution (C) itself and the system was prepared for the next insertion of sample.

3. Results and discussion

3.1. Optimization of solid-phase extraction

In order to extract resveratrol from beer, a new extraction procedure was developed. The fluorescent photodegradation product generated from resveratrol is sorbed on the anion-exchanger Sephadex QAE A-25, thus excluding a lot of organic species from the matrix. However, a previous clean-up step was necessary to eliminate other species which could be retained on the solid-phase and compete with the photodegradation product for the active sites. As we could check, the most serious interfering species was resveratrol-3-O- β -D-glycoside (piceid), which is also present in beer [26] and shows a very similar behaviour to that of resveratrol in the flow-system. Under UV irradiation, piceid also originated a fluorescent photoproduct, which was retained on Sephadex QAE

Table 1

Recovery percentages of *trans*-resveratrol according to the solvent assayed for extraction.

Solvent	Recovery percentage (%)	
	Resveratrol	Piceid
Methanol:water (20:80, v/v)	0	0
Methanol:water (35:65, v/v)	0	35
Methanol:water (40:60, v/v)	0	81
Methanol:water (50:50, v/v)	10	80
Methanol:water (80:20, v/v)	75	81
Methanol	82	83

A-25 ($257/382\text{ nm}$, $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$) and showed a complete spectral overlapping with the photoproduct of resveratrol. Caffeic and gallic acids interfered with the determination of resveratrol when their amounts were over 5 and 80-fold (w/w) that of resveratrol. Nevertheless, no interference was observed for the amounts of catechin and quercetin usually found in beer.

According to the literature [10], a preliminary removal of hop resins and lipids is most likely necessary to recover high amounts of polyphenols. Although diethyl ether is often used for this previous cleaning, the significant solubility of resveratrol in this solvent makes impossible its use in this case. The removal of hydrophobic compounds was carried out with toluene and cyclohexane by following a procedure previously described [10], by introducing slight modifications.

Next, liquid-liquid extraction was tested for the selective extraction of resveratrol from beer. Diethyl ether and ethyl acetate are the solvents commonly used for the extraction of resveratrol and piceid from liquid samples. In the case of beer, diethyl ether provided an extraction recovery for resveratrol close to 80%, but piceid was also significantly extracted (5%). The use of a more polar solvent such as ethyl acetate even provided a better extraction percentage for piceid (10%). Consequently, the liquid-liquid extraction was discarded for the extraction of resveratrol and SPE was chosen for this purpose.

In order to optimize the SPE procedure, different solvents for the rinsing and elution steps were utilised: water, ethyl acetate, diethyl ether and methanol. With this purpose, the washout fractions were monitored with the UV-vis spectrophotometer from 250 to 425 nm. A first rinsing step with water allowed the elimination of most polar compounds from the matrix. The optimum water volume was studied in the range 2–8 mL and found to be 6 mL. In a second rinsing step, aqueous solutions containing different methanol percentages (20, 35, 40 and 50%) were assayed for the removal of piceid and other possible polar interferences of beer, without eluting resveratrol (Table 1). 6 mL of a 40% methanol solution proved to be the optimal one for this purpose.

Ethyl acetate, diethyl ether and methanol (80 and 100%) were tested for the elution of resveratrol and, finally, pure methanol was selected because it gave the best recovery (82%).

3.2. Preliminary tests of sorption

Resveratrol is weakly fluorescent and extremely photo-sensitive. When protected from light the *trans* form is stable for months, unless in high-pH buffer, whereas the *cis* form is stable only at neutral pH when completely protected from light [34]. Intense UV irradiation of solutions of *trans*-resveratrol originates first its conversion into *cis*-resveratrol and then leads to the formation of a highly fluorescent compound [25,35]. This photoconversion allows the total (*trans*-isomer plus *cis*-isomer) resveratrol determination in a sample. On the basis of literature data, it can be assumed that the fluorescent photoproduct gener-

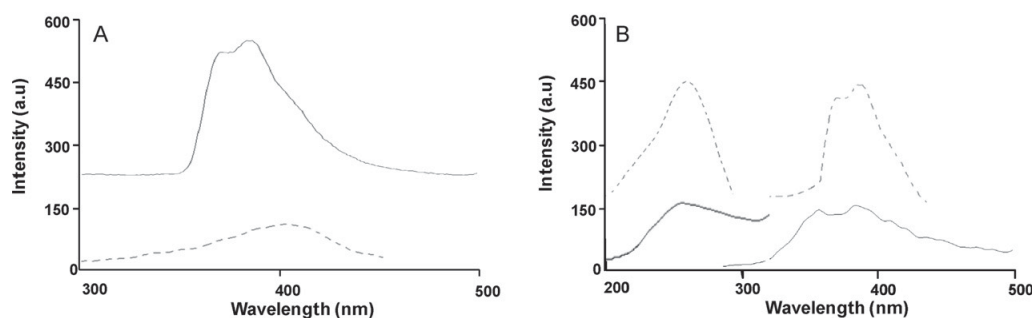


Fig. 2. Fluorescence spectra of *trans*-resveratrol and its photoproduct. (A) Emission spectra on Sephadex QAE A-25: *trans*-resveratrol (dashed line), photoproduct of *trans*-resveratrol (continuous line), 100 ng mL^{-1} *trans*-resveratrol. (B) Excitation and emissions spectra of the photoproduct of *trans*-resveratrol: in homogeneous solution (continuous line), on Sephadex QAE A-25 (dashed line), 2.5 mg L^{-1} *trans*-resveratrol (in solution); 90 ng mL^{-1} *trans*-resveratrol (in solid phase), pH 6.0; 15 s irradiation time.

ated from *trans*- or *cis*-resveratrol is a phenanthrene derivative, 2,4,6-trihydroxyphenanthrene [36].

In order to improve sensitivity and selectivity of the determination of resveratrol by measuring the fluorescence of its photochemically generated photoproduct, anion-exchangers (Sephadex QAE A-25 and Sephadex DEAE-25), cation-exchangers (Sephadex SP C-25 and Sephadex CMC-25) and a non-ionic support (C_{18} silica gel) were tested, at different pH values (below 7.0), to retain this compound. These tests proved that C_{18} silica gel and both anion-exchangers allowed the retention of both, *trans*-resveratrol and its photoproduct. Finally, Sephadex QAE A-25 was selected for retention purposes since, at weakly acidic pH value, it provided the maximum analytical signal. In addition, the anionic character of this solid-support could provide a higher selectivity in the determination of resveratrol.

No spectral changes were observed for *trans*-resveratrol spectra retained on Sephadex QAE A-25, in the range of pH studied (2.0–7.0), showing an excitation maximum at 326 nm and an emission maximum at 406 nm. In the same pH range, the photoproduct of *trans*-resveratrol presented excitation and emission maxima at 277 and 382 nm, respectively. The fluorescence signal was greatly improved by the sorption of *trans*-resveratrol or its photoproduct on the solid-support and their consequent preconcentration on this latter. Finally, the measurement of the fluorescence of the photoproduct was chosen since it provided the highest sensitivity (Fig. 2A). In addition, taking into account the complexity of the matrix, we considered that this choice could allow a better selectivity in the method to be developed. This way, the improvement in the analytical signal was 60-fold, when comparing to that obtained in homogeneous solution under the same working conditions (Fig. 2B).

The instrument excitation and emission slits were optimized at 20 and 20 nm, respectively, since these values provided the best ratio fluorescence signal–background noise. In the same way, the voltage of the photomultiplier tube was set at 590 V. The research was performed at room temperature, observing no difference in the analytical signal between 15 and 30°C .

3.3. Nature and pH of sample and carrier solution

The pH showed to be a key variable since the analytical signal changed significantly with the pH of the sample and the carrier solution. It is necessary to point out that the optimum working pH value will be that providing the maximum conversion of *trans*-resveratrol in the fluorescent photodegradation product, the maximum fluorescence of the photoproduct generated and the maximum sorption of this latter on the solid support in the detection area.

The study of the influence of pH of the sample was performed by varying it between 2.0 and 10.0, using HNO_3 or NaOH solutions. A maximum and constant fluorescence was obtained in the pH range 5.5–7.0 (Fig. 3). Higher or lower pH values caused a drastic decrease in the fluorescence signal. A pH value of 6.0 was selected for the next experiments. Several buffer solutions at pH 6.0 were tested in order to adjust the pH of the sample solution (citric acid/sodium hydroxide; sodium dihydrogen phosphate/sodium hydroxide; sodium acetate/acetic acid) and the best results were achieved with NaAc/HAc buffer solution. The influence of its concentration on the analytical response was assayed in the range 0.005 – 0.05 mol L^{-1} and finally, a 0.01 mol L^{-1} concentration was chosen for buffering the sample, since it provided the best analytical signal. Higher concentrations caused a lower fluorescence signal, probably due to the competition between buffer ions and the photodegradation product for the active sites in the ionic solid-support. Lower concentrations originated a lower signal too, since the sorption of the photodegradation product on the solid-support took place just above the light beam in the detection area.

The effect of pH of the carrier solution was studied by inserting a 100 ng mL^{-1} resveratrol solution (pH 6.0) into different aqueous solutions adjusted at pH values ranging from 1.0 to 7.0 with HNO_3 (Fig. 3). The maximum fluorescence signal was obtained at pH 3.0. For pH values higher than 3.0 a drastic decay in the fluorescence signal was obtained, keeping this latter constant and negligible from 4.0 to 7.0. The fluorescence signal also decreased for pH values lower than 3.0 and, in addition, overpressure problems were observed due to the compaction of the solid-support. Finally, a pH of 3.0 for the carrier solution was chosen as optimum. None of the

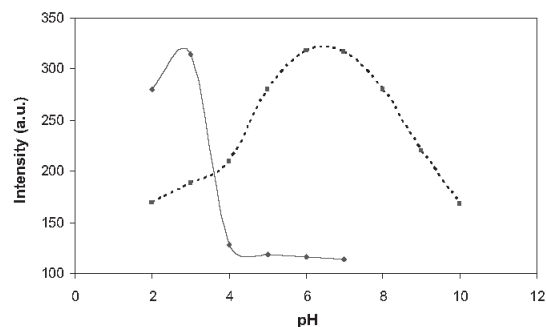


Fig. 3. Influence of pH of the sample (dashed line) and carrier (continuous line) solutions. 100 ng mL^{-1} *trans*-resveratrol; carrier solution, 0.001 mol L^{-1} HNO_3 ; irradiation time, 20 s.

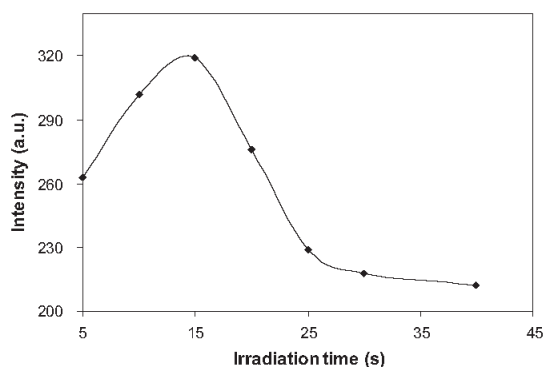


Fig. 4. Influence of irradiation time. 100 ng mL⁻¹ *trans*-resveratrol; sampling time, 40 s; flow-rate, 1.9 mL min⁻¹; photoreactor length, 250 cm.

tested aqueous solutions provided the elution of the photoproduct of *trans*-resveratrol in a reasonable time.

With the purpose of achieving the quick and complete elution of the fluorescent photoproduct from the solid-support, thus increasing the sampling frequency, different electrolytes (NaCl, KCl, NaNO₃, Na₂CO₃) were added to the aqueous carrier solution (pH 3.0), in concentrations ranging from 0.01 to 0.1 mol L⁻¹. The best results were obtained for a 0.06 mol L⁻¹ NaCl concentration. This solution provided the highest analytical signal and a rapid and complete elution of the species monitored from the solid-support, which was completely regenerated. Consequently, the use of an additional eluting solution was not necessary. Although NaCl concentrations higher than 0.06 mol L⁻¹ provided a quicker elution of the photoproduct, they also originated a significant decrease in the analytical signal. Therefore, that NaCl concentration was selected as a compromise between analytical signal and peak width. Lower NaCl concentrations resulted in analytical signals similar to that obtained with 0.06 mol L⁻¹ NaCl, but wider peaks were also obtained, thus decreasing the throughput. The assay of different buffer solutions to adjust the pH of the carrier solution at 3.0 did not provide a significant improvement in the analytical signal or in the time of elution of the photoproduct. Therefore, the carrier solution consisted of 0.06 mol L⁻¹ NaCl/0.001 mol L⁻¹ HNO₃ (pH 3.0).

3.4. Irradiation time

Another key variable for the generation of a fluorescent photodegradation product from *trans*-resveratrol is the residence time of the sample plug inside the photoreactor under UV irradiation. To optimize this variable, a 100 ng mL⁻¹ *trans*-resveratrol solution was inserted in the system (sampling time, 40 s; flow-rate, 1.9 mL min⁻¹), the flow was stopped just when the whole plug of sample was within the photoreactor (250 cm) and the sample was irradiated for increasing periods of time. The results showed that the kinetic of photo-degradation of *trans*-resveratrol in the working conditions is very quick. The fluorescence signal increased with the irradiation time to reach a maximum value for 15 s and thereafter it decreased (Fig. 4). The shape of the curve obtained suggests a two-step photolysis mechanism, consisting of the formation of a strongly fluorescent photoproduct and the posterior photo degradation of this compound into non-fluorescent product(s). The length of the transport system between the photochemical reactor and the flow-cell was the minimum allowing both units to be connected.

The residence time of *trans*-resveratrol in the photochemical reactor and, consequently, the irradiation time can be controlled

Table 2
Analytical parameters.

Parameter	
Linear dynamic range (ng mL ⁻¹)	3.3–100
Calibration graph	
Intercept	-10.162
Slope (mL ng ⁻¹)	3.284
Correlation coefficient	0.9998
Detection limit (DL) (ng mL ⁻¹)	1.0
Quantification limit (QL) (ng mL ⁻¹)	3.3
RSD (%) (n = 10)	1.8 ^a
Throughput (h ⁻¹)	12

^a *trans*-Resveratrol concentration, 40 ng mL⁻¹.

by the flow-rate of the carrier solution and/or the length of the tubing around the UV lamp. Firstly, the optimum irradiation time (15 s) was established by using a 2.2 mL min⁻¹ flow-rate combined with a 110 cm long photoreactor. This flow-rate value was chosen since it provided the highest throughput and higher flow-rates originated overpressure problems in the system. After this, by keeping constant the sample volume inserted in the system, which implied varying the sampling time, different combinations of photoreactor length and flow-rate (0.8–2.0 mL min⁻¹) were assayed. The use of shorter photoreactor lengths combined with flow-rates lower than 2.2 mL min⁻¹ provided lower peak heights and throughputs. Consequently, the optimum irradiation time was established by combining a 110 cm photoreactor and a 2.2 mL min⁻¹ flow-rate.

3.5. Sampling time

As known in FI-SPS systems, the insertion of increasing sample volumes in the system originates an improvement in sensitivity (for a constant concentration of analyte). This is a consequence of the sorption of increasing amounts of the species monitored on a constant amount of solid-support. In addition, the improvement in sensitivity allows the reduction of matrix effects by means of a previous dilution of the sample, which is carried out before its insertion in the system. In the case of multicommutated systems, the sample volume can be easily controlled by varying the sampling time [37].

The influence of this variable was tested by inserting in the flow-system a 50 ng mL⁻¹ *trans*-resveratrol solution for sampling times ranging from 10 to 90 s. This is easily achieved by varying the time during which the valve V₁ is activated (Fig. 1). The fluorescence signal increased linearly until a value of 80 s. Sampling times above this value did not suppose a significant increment in the analytical signal. Taking into account that the flow-rate and sampling time were established at 2.2 mL min⁻¹ and 80 s, respectively, it corresponded with a sample volume of 2900 μL, which was finally selected.

3.6. Analytical parameters

Taking into account the above optimized working conditions, the analytical parameters of the system were studied (Table 2). Calibration curve was constructed by following the procedure above described after injecting sample solutions in triplicate, containing increasing concentrations of *trans*-resveratrol. Quantification was carried out by using peak height as analytical signal. The data were fitted by standard least-squares treatment. The proposed methodology responds linearly in the concentration range 3.3–100 ng mL⁻¹. The detection and quantification limits were estimated as the concentration of analyte which produced an analytical signal equal to three and ten times, respectively, the standard deviation of the background fluorescence [38,39].

The intra-day repeatability was established for ten independent analyses of sample solutions containing 40 ng mL⁻¹ of *trans*-

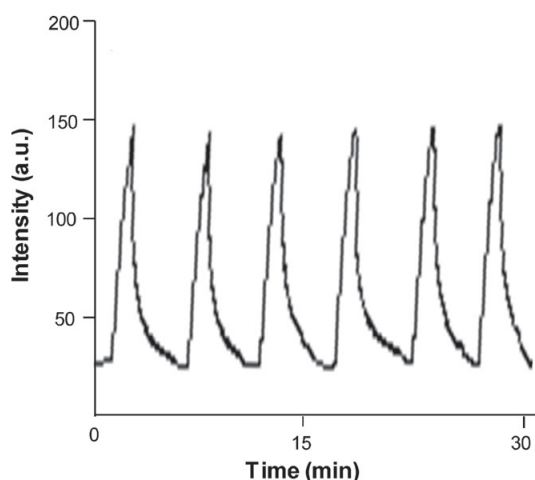


Fig. 5. Typical analytical signal registered for the photoproduct of *trans*-resveratrol. 40 ng mL⁻¹ *trans*-resveratrol, n = 6.

resveratrol, RSD being 1.8%. Fig. 5 shows the typical registered analytical signal. The inter-day repeatability was also performed for ten consecutive days obtaining RSD 3.2%.

3.7. Analytical applications

When the method was applied to the analysis of beer samples an important matrix effect was observed, which was not completely eliminated by the pre-treatment procedure developed. Therefore, the standard addition method was utilised for calibration of the method. The slope of the calibration curve obtained by spiking the final extracts with *trans*-resveratrol was different to that obtained by spiking the original samples. In addition, in both cases the slopes were lower than that obtained by external calibration. Therefore, the matrix effect is due to the presence in the final extracts of interfering species and the incomplete recovery of resveratrol after the pre-treatment. This latter is probably caused by the presence in beer of supramolecular structures involving hop constituents. Consequently, the analysis was carried out by spiking different aliquots of a beer sample with increasing amounts of *trans*-resveratrol, before subjecting them to the whole analytical procedure. The matrix effect was evaluated by comparing the slopes of aqueous standards and standard addition calibration graphs for different beer samples ($m_{\text{standard}}/m_{\text{standard addition}} \approx 1.1$).

The results obtained are shown in Table 3. The resveratrol content found in three of the samples analysed was lower than quantification limit (QL) of the method proposed. Consequently, a recovery study was performed on these samples at two concentration levels. In all the cases good recoveries, ranging from 99.5 to 101.5%, were achieved.

The applicability of the proposed method to the analysis of resveratrol in beer was demonstrated by comparison with a reference HPLC-MS/MS method [26]. In all the cases the results obtained were in good agreement with those obtained by the reference method.

4. Conclusions

For the first time an automatic spectroscopic method for the analysis of resveratrol in beer is reported. The method makes use of the on-line photodegradation of resveratrol in a multicommuted flow-system and the posterior monitoring of the generated

Table 3
Determination of resveratrol in commercial beers.

Sample	Proposed method		Reference method ^a
	Added (ng mL ⁻¹)	Found $\pm \sigma^b$ (ng mL ⁻¹)	Found $\pm \sigma^b$ (ng mL ⁻¹)
Top-fermented			
Ale 1	–	6.2 \pm 0.5	<QL
Ale 2	–	<DL	<DL
	20	20.3 \pm 0.5	20.8 \pm 0.6
	40	40.6 \pm 0.7	41.0 \pm 1.2
Bitter	–	<DL	<DL
	60	60.5 \pm 1.1	59.6 \pm 1.3
	80	80.8 \pm 1.3	79.2 \pm 1.4
Stout	–	6.3 \pm 0.3	<QL
Bottom-fermented			
Lager 1	–	<DL	<DL
	20	19.9 \pm 0.5	19.5 \pm 0.5
	40	40.3 \pm 1.0	39.8 \pm 0.7
Lager 2	–	4.1 \pm 0.2	<DL
Pilsen 1	–	14.1 \pm 0.5	<QL
Pilsen 2	–	12.2 \pm 0.5	<QL

^a Ref. [26]. QL, 15 ng mL⁻¹; DL, 5 ng mL⁻¹.

^b Three replicates.

highly fluorescent photoproduct (2,4,6-trihydroxyphenanthrene), once it is retained on an appropriate solid-support (Sephadex QAE A-25). The extraction of resveratrol from beer by SPE with methanol improves significantly selectivity, since it allows removing its glycoside (piceid), which is a serious interfering species. The measurement of the fluorescence of the photoproduct of resveratrol in solid-phase also contributes to improve selectivity, allowing the exclusion of a large amount of organic species of the matrix.

The method developed shows characteristics such as: (a) high sensitivity, because of the sorption of the photoproduct of resveratrol on a small amount of the solid support; (b) low reagent consumption; (c) easy to handle; (d) rapidity and simplicity and (e) low cost. It can be considered as an interesting alternative to the chromatographic determination of resveratrol in beer, since it provides higher throughputs and lower detection limits and cost of instrumentation.

Although the amounts of resveratrol found in some of the samples analysed are below the QL of the proposed method, a DL lower than those previously reported (HPLC-MS/MS and GC-MS) has been reached, using a simple and rapid optosensing device, with low-cost instrumentation. Therefore, in our opinion the proposed method constitutes an interesting contribution to the analysis of resveratrol, and in general of stilbenes, in beer. In spite of the low concentrations of resveratrol found in beer, taking into account the important health benefits of resveratrol, we think that it would be very interesting to carry out complementary studies in order to produce resveratrol-enriched hop extracts, in a similar way to studies currently carried out to enhance resveratrol content in wines.

Acknowledgements

The authors acknowledge the financial support from Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa (Junta de Andalucía), Project P07-FQM-02673. L.M.G. also acknowledges research fellowship from Spanish MEC.

References

- [1] D.M. Goldberg, E. Ng, A. Karumanchiri, J. Yan, E.P. Diamandis, G.J. Soleas, J. Chromatogr. A 708 (1995) 89–98.
- [2] H.J. Um, J.H. Bae, J.-W. Park, H. Suh, N.Y. Jeong, Y.H. Yoo, T.K. Kwon, Int. J. Oncol. 36 (2010) 1007–1013.
- [3] S.S. Karuppagounder, J.T. Pinto, H. Xu, H.L. Chen, M.F. Beal, G.E. Gibson, Neurochem. Int. 54 (2009) 111–118.
- [4] O. Ates, S.R. Cayli, N. Yucel, E. Altınöz, A. Kocak, M.A. Durak, Y. Turkoz, S. Yolçulu, J. Clin. Neurosci. 14 (2007) 256–260.

- [5] E.O. Lee, H.J. Park, J.L. Kang, H.-S. Kim, Y.H. Chong, *J. Neurochem.* 112 (2010) 1477–1488.
- [6] P. Langcake, R.J. Pryce, *Phytochemistry* 16 (1977) 1193–1196.
- [7] R.M. Lamuela-Raventós, A.L. Waterhouse, *J. Agric. Food Chem.* 41 (1993) 521–523.
- [8] V.S. Sobolev, R.J. Cole, *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999) 1435–1439.
- [9] Ö. Tokuşoğlu, M.K. Ünal, F. Yemiş, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 5003–5009.
- [10] D. Callemien, V. Jerkovic, R. Rozenberg, S. Collin, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 424–429.
- [11] G. Lermusieau, S. Collin, *Molecular Methods of Plant Analysis. Analysis of Taste and Aroma*, vol. 21, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2002, pp. 69–88.
- [12] M. Spanilá, J. Pazourek, M. Farková, J. Havel, *J. Chromatogr. A* 1084 (2005) 180–185.
- [13] J.J. Berzas Nevado, A.M. Contento Salcedo, G. Castañeda Peñalvo, *Analyst* 124 (1999) 61–66.
- [14] A. Antonelli, C. Fabri, G. Lercker, *Chromatographia* 42 (1996) 469–472.
- [15] P. Viñas, N. Campillo, N. Martínez-Castillo, M. Hernández-Córdoba, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 1279–1284.
- [16] R.E. Anli, N. Vural, E. Kizile, *J. Inst. Brew.* 114 (2008) 239–245.
- [17] M.E. Juan, R.M. Lamuela-Raventós, M.C. De La Torre-Boronat, J.M. Planas, *Anal. Chem.* 71 (1999) 747–750.
- [18] K.D. McMurtrey, J. Minn, K. Pobanz, T.P. Schultz, *J. Agric. Food Chem.* 42 (1994) 2077–2080.
- [19] J. Zhou, H. Cui, G. Wan, H. Xu, Y. Pang, C. Duan, *Food Chem.* 88 (2004) 613–620.
- [20] Ö. Gürbüz, D. Göçmen, F. Dağdelen, M. Gürsoy, S. Aydın, I. Şahin, L. Büyükkaysal, M. Usta, *Food Chem.* 100 (2007) 518–525.
- [21] Z. Piñeiro, M. Palma, C.G. Barroso, *J. Chromatogr. A* 1110 (2006) 61–65.
- [22] I. Durán-Merás, T. Galeano-Díaz, D. Airado-Rodríguez, *Food Chem.* 109 (2008) 825–833.
- [23] L. Vlase, B. Kiss, S.E. Leucuta, S. Gocan, *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.* 32 (2009) 2105–2121.
- [24] F. Buiarelli, F. Coccioli, R. Jasionowska, M. Merolle, A. Terracciano, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21 (2007) 2955–2964.
- [25] T. Galeano-Díaz, I. Durán Merás, D. Airado Rodríguez, *Anal. Bioanal. Chem.* 387 (2007) 1999–2007.
- [26] V. Jerkovic, F. Nguyen, A. Timmermans, S. Collin, *J. Inst. Brew.* 114 (2008) 143–149.
- [27] A. Zotou, E. Frangi, *Chromatographia* 67 (2008) 789–793.
- [28] L. Mercolini, M.A. Saracino, F. Bugamelli, A. Ferranti, M. Malaguti, S. Hrelia, M.A. Raggi, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 1007–1014.
- [29] L. Cai, J.A. Koziel, M. Dharmadhikari, J. (Hans) van Leeuwen, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 281–287.
- [30] J. López-Flores, M.L. Fernández-De Córdoba, A. Molina-Díaz, *Anal. Chim. Acta* 535 (2005) 161–168.
- [31] B.F. Reis, M.F. Gine, E.A.G. Zagatto, J.L.F.C. Lima, R.A. Lapa, *Anal. Chim. Acta* 293 (1994) 129–138.
- [32] F.R.P. Rocha, B.F. Reis, E.A.G. Zagatto, J.L.F.C. Lima, R.A.S. Lapa, *Anal. Chim. Acta* 468 (2002) 119–131.
- [33] M. Catalá Icardo, J.V. García Mateo, J. Martínez Calatayud, *Trends Anal. Chem. (TrAC)* 21 (2002) 366–378.
- [34] E. Fan, K. Zhang, C. Yao, C. Yan, Y. Bai, S. Jiang, *Chromatographia* 62 (2005) 289–294.
- [35] J.P. Roggero, C. García-Parrilla, *Sci. Aliments* 15 (1995) 411–422.
- [36] T. Galeano-Díaz, I. Durán-Merás, D. Airado-Rodríguez, *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 3110–3119.
- [37] J. López Flores, A. Molina-Díaz, M.L. Fernández de Córdoba, *Anal. Chim. Acta* 585 (2007) 185–191.
- [38] IUPAC, *Spectrochim. Acta B* 33 (1978) 242–245.
- [39] *Anal. Chem.* 52 (1980) 2242–2249.

**Automatic optosensing device based on photo-induced
fluorescence for determination of piceid in cocoa-containing
products**

Analytical and Bioanalytical Chemistry 399 (2011) 965-972

Automatic optosensing device based on photo-induced fluorescence for determination of piceid in cocoa-containing products

Lucía Molina-García · Antonio Ruiz-Medina ·
María Luisa Fernández-de Córdoba

Received: 17 July 2010 / Revised: 19 September 2010 / Accepted: 28 September 2010 / Published online: 16 October 2010
© Springer-Verlag 2010

Abstract Piceid (3,4',5-trihydroxystilbene-3- β -D-glucoside) is a stilbene which occurs naturally in various families of plants and has been shown to protect lipoproteins from oxidative damage and to have cancer chemopreventive activity. This paper deals with the determination of piceid in cocoa-containing products by using photo-induced fluorescence and the aid of a multicommutated continuous-flow assembly which was provided with an on-line photoreactor. A strongly fluorescent photoproduct is generated from piceid when it is irradiated under UV light for 30 s, which is retained on Sephadex QAE A-25 and directly monitored on this active solid support at 257/382 nm ($\lambda_{exc}/\lambda_{em}$, respectively). The pre-concentration of the photoproduct of piceid on the solid support greatly improves both sensitivity and selectivity. The influence of different experimental parameters, both chemical (pH, ionic strength) and hydrodynamic (irradiation time, flow rate, photoreactor length, sampling time), was tested. The sample pre-treatment included delipidation with toluene and cyclohexane, stilbene extraction with ethanol/water (80:20, v/v) and clean-up by solid-phase extraction on C₁₈ cartridges and methanol/water (40:20, v/v) as eluting solution. This procedure allowed the elimination of the aglycon of piceid, resveratrol and other potential interfering species and a recovery of about a 90% piceid. The method was applied to the analysis of piceid in cocoa powder, dark chocolate and milk chocolate. The quantification limits were 1.4, 1.1 and 0.09 mg kg⁻¹, respectively. Relative standard deviations ranged from 1.8%

to 3.1%. This is the first reported non-chromatographic method for determination of piceid in these foods.

Keywords Piceid · Multicommutation · Optosensor · Photo-induced fluorescence · Cocoa powder · Chocolate

Introduction

It is well known that a diet rich in fruit and vegetables helps to prevent cardiovascular problems, certain types of cancer, atherosclerosis and ageing-related disorders. This effect can be attributed to their content in polyphenols, which constitute a family of compounds whose antioxidant properties are widely documented [1, 2]. In the last years, much attention has been paid to stilbenes, a kind of polyphenol which occurs naturally in a number of plant families and can be synthesised after a stress, being considered, in this case, as phytoalexins [3]. In particular, resveratrol (3,4',5-trihydroxystilbene), which is mainly present in grapes and red wine, has demonstrated interesting physiological effects such as a cardioprotective action due to inhibition of platelet aggregation [4] and oxidation of human low-density lipoprotein (LDL) [5]; inhibition of cellular events associated with tumour initiation, promotion and propagation [6, 7]; anti-inflammatory activities [8]; prevention and control of the lipid peroxidation in membranes [9] and preventive Alzheimer's disease [10]. Resveratrol can also occur in a glycosylated form, called piceid. Both resveratrol and piceid can occur as the *cis* or *trans* stereoisomers, with the *trans* form being the dominant form.

A number of studies have demonstrated that piceid has biomedical properties similar to those mentioned above for resveratrol. Piceid isomers have been shown to be also active in inhibiting eicosanoid synthesis [11] and reducing the

L. Molina-García · A. Ruiz-Medina ·
M. L. Fernández-de Córdoba (✉)
Department of Physical and Analytical Chemistry,
University of Jaén,
Campus Las Lagunillas s/n,
23071 Jaén, Spain
e-mail: mferna@ujaen.es

elevation of lipid levels [12]. *trans*-Piceid inhibits oxidation of human LDL [13] and platelet aggregation [14] and acts as a tumour and metastatic carcinoma inhibitor [15]. The absorption of some phenols from the diet is enhanced by conjugation with glucose [16], and then piceid could be more efficiently absorbed than its aglycone, resveratrol. Piceid has been reported in wines [17, 18], cranberries [19], peanuts [20], hop [21] and *Polygonum cuspidatum*, a traditional medicinal herb [22], and it is probably the most abundant form of resveratrol in nature [23]. Recently, *trans*-piceid was identified in chocolate and cocoa [24, 25] extracts, coming from the seeds of *Theobroma cacao* L. (Sterculiaceae), which are well known to be rich in polyphenols [26]. *trans*-Piceid concentrations ranged from 2.4 to 5 times higher on average than the level of *trans*-resveratrol in the same product categories. Therefore, cocoa-containing products such as chocolate and cocoa powder, which are consumed widely, can be considered as significant dietary sources of piceid. In this context, dark chocolate with high content of cocoa has been recognised as an important alternative antioxidant in the diet [27].

To date, only two high-performance liquid chromatography (HPLC) methods have been reported for the measurement of *trans*-piceid in cocoa-containing products using mass spectrometry [24] and diode array detection [25], respectively. In both methods, samples were previously delipidated, and stilbenes were extracted with ethanol/water (80:20, v/v) [24], previous hydrolysis for 8 h, and ethyl acetate [25]. A potential limitation of these chromatographic methods in the determination of *trans*-piceid is the risk of photoisomerisation of *trans*- to *cis*-isomer [28], which makes necessary conducting all procedures in low-light environments to minimise light-induced degradation. In addition, at the present time there are no commercially available standards for *cis*-isomers. Although this latter can be obtained from *trans*-isomer by exposure to UV radiation [29], this photoisomerisation reaction is very dependent on experimental conditions and can only be used for quantitative production of *cis*-isomers under very well-controlled experimental conditions [30]. These problems can be overcome when the total amount of piceid (*cis*- plus *trans*-isomers) is determined.

The aim of the present work was to develop an automatic fluorimetric method for the analysis of total piceid in chocolate and cocoa powder as an alternative to its chromatographic determination. The method is based on the on-line photo-conversion of *trans*-piceid in a fluorescent compound by using a multicommutated assembly [31, 32]. Although *trans*-piceid itself shows a weak fluorescence, intense UV irradiation gives rise to its conversion in the *cis*-isomer, which quickly disappears in favour of strongly fluorescent photoproducts [33]. The generated photoproduct is monitored when retained on an active solid support packed in a flow cell placed in the detection area of the flow system. Solid-phase

extraction (SPE) was used to extract selectively piceid and separate it from its aglycon (resveratrol) and other interfering substances present in the samples analysed. The method was successfully applied to the determination of piceid in cocoa powder, dark chocolate and milk chocolate. To our best knowledge, for the first time a fluorimetric method is proposed for the analysis of piceid in these products.

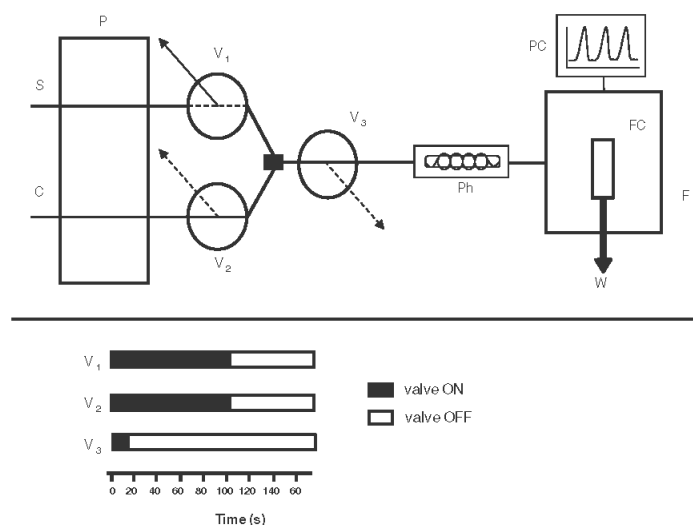
Materials and methods

Apparatus, instrumentation and manifold

Fluorescence measurements and spectra acquisition were performed on a Cary Eclipse spectrofluorimeter (Varian Inc., Mulgrave, Australia) controlled by a microprocessor fitted with the Cary Eclipse software package. The instrumental parameters established were 10 and 10 nm for excitation and emission slits, respectively, and 670 V for the voltage of photomultiplier tube. The excitation and emission wavelengths were established at 257 and 382 nm, respectively. UV-visible spectra were recorded with a Varian Cary 50 Spectrophotometer (Madrid, Spain) controlled by means of a PC fitted with the Varian computerised spectroscopy software, WIN-UV. A Hellma cell 100-QS with a light path length of 10 mm was employed.

Figure 1 shows the manifold employed in the system development. A four-channel Gilson Minipuls-3 (Villiers Le Bell, France) peristaltic pump with rate selector and pump tubes type Solvflex (Elkay Products, Shrewsbury, MA, USA) were used for propelling solutions. An electronic interface based on ULN 2803 integrated circuit was used to control the three 161 T031 NResearch three-way solenoid valves (Neptune Research, MA, USA). The valves were operated at an electric potential of 12 V and a direct current of 100 mA. The software for system control was developed in Visual Basic 6.0 by our research group. For the photochemical on-line conversion, a home-made photoreactor was prepared by loosely coiling 189 cm of polytetrafluorethylene tubing (0.8 mm i.d.) around a low-pressure mercury lamp (15 W, 254 nm). The UV lamp was placed in an aluminium box for maximum light reflection and heat dissipation, the use of a cooling device not being necessary. The photoreactor was placed between V_3 and the detection area. All the experiments were carried out at room temperature. Sephadex QAE A-25 resin was used as active support placed in a 176.752 Hellma QS (Müllheim, Baden, Germany) flow cell (inner volume, 25 μ L; optical length, 1.5 mm). The flow-cell outlet was locked with glass wool to avoid bead movement and allow continuous flow. The cell was filled with an aqueous slurry of the solid support just up to a height which enabled the light beam to pass completely through the solid phase. Higher levels would

Fig. 1 Multicommutated flow-injection system. *S* sample (buffered with 0.02 mol L⁻¹ NaAc/HAc buffer solution, pH=5.5); *C* carrier solution (0.06 M NaCl/0.001 M HNO₃, pH=3.0); *P* peristaltic pump; *V*₁, *V*₂ and *V*₃ three-way solenoid valves; *Ph* photoreactor; *F* spectrofluorimeter; *FC* flow cell (filled with Sephadex QAE A-25); *W* waste; *PC* computer. For each solenoid valve, the *solid* and *dotted* lines refer to “Off” and “On” positions, respectively. Flow rate, 1.9 mL min⁻¹. The scheme at the lower part shows the valve time program (sampling time, 90 s)



cause the analyte pre-concentration on the upper part of the solid support, above the excitation light beam in the detection area, and the consequent decreasing signal; lower levels would cause a decreasing signal too, due to the light beam that would pass partially or completely through the flowing solution.

A vacuum system 12-port Visiprep SPE Vacuum Manifold (Supelco, Bellefonte, PA) with octadecyl (C₁₈) Bakerbond SPE cartridges of 6 mL with 500 mg of packing material (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA) and a Heidolph rotary evaporator (Selecta, Barcelona, Spain) (40–50 °C water bath) were also used.

Reagents and solutions

All reagents were analytical reagent grade, and Milli-Q (Millipore, Bedford, MA) water was used throughout.

trans-Piceid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) stock solution, 200 mg L⁻¹, was prepared by dissolving the appropriate amount in ethanol (Panreac, Barcelona, Spain). It was kept away from light with an aluminium foil and stored at 4 °C in a refrigerator, remaining stable for at least 4 weeks. Working standard solutions were prepared daily by taking an aliquot of the stock solution and diluting with 0.02 mol L⁻¹ NaCH₃COO/HCH₃COO (NaAc/HAc) buffer solution, pH=5.5. The working solutions were stable for at least 8 h, when protected from light, which was enough to make the daily experiments.

The carrier stream consisted of 0.06 mol L⁻¹ NaCl/0.001 mol L⁻¹ HNO₃ solution (pH=3.0). It was prepared by dissolving the required weight of NaCl in water and setting the pH to 3.0 with HNO₃ solution (both obtained of Panreac) with the aid of a pH-meter.

Sephadex QAE A-25 (40–120 μm average particle size) (Sigma, Alcobendas, Madrid, Spain) was used as active solid support for filling the flow cell. Other cation and anion exchangers (Sephadex SP C-25, Sephadex CM C-25 and Sephadex DEAE A-25, all of them having 40–120 μm average particle size) (Sigma) and C₁₈ bonded phase silica gel beads (55–105 μm average particle size) (Waters, Milford, MA, USA) were also tested for retention of the target compounds. Methanol, ethanol, nitric acid, toluene and cyclohexane were obtained from Panreac.

Treatment of samples

The samples were purchased from local markets. Protection against light was kept during all the analysis, and the samples were stored in darkness at 4 °C. A previous lipid removal with toluene and cyclohexane was carried out to improve the subsequent extraction. Chocolate samples were blinded and reduced to powder. The cocoa powder samples did not require grinding.

One gram (cacao powder/dark chocolate) or 2 g (milk chocolate) of sample was spiked with an appropriate amount of *trans*-piceid and treated under gentle stirring in consecutive 3-min steps, first with 5 mL of toluene (three times) and then with 5 mL of cyclohexane (three times). At the end of each step, the mixture was centrifuged for 5 min at 4,200×g, and the supernatant was discarded. Finally, the defatted sample was dried under vacuum (30 °C) to get rid of residual solvent.

The delipidated pellet was extracted three times with 4 mL of ethanol/water (80:20, v/v) under gentle stirring, each step for 5 min. At the end of each extraction, the sample was centrifuged for 5 min at 4,200×g, and the supernatant was

collected. Then the combined supernatants were dried under vacuum (30 °C) to remove any residual solvent.

A C₁₈ cartridge was conditioned by passing consecutively 3 mL of methanol and 6 mL of water. Subsequently, stilbenoid residual was passed through the cartridge at a flow rate of 3–4 mL min⁻¹ under vacuum. Then, the cartridge was washed with 6 mL of water in order to remove the most polar interfering substances. Finally, the elution of *trans*-piceid retained in the cartridge was carried out with 3 × 2 mL of methanol/water (40:60, v/v), and the eluate was concentrated to dryness under a gentle stream of nitrogen. The final residue was solubilised in 10 mL of 0.02 mol L⁻¹ NaAc/HAc buffer solution, pH=5.5.

Procedure

Firstly, the peristaltic pump and the UV lamp were turned on, and the carrier stream was propelled at 1.9 mL min⁻¹ to wash the whole flow system (Fig. 1) until a stable baseline was recorded, all the valves being turned off. Thus, the carrier solution flowed through the system, while the sample solution was recycled to its vessel.

The determination of piceid was carried out by following the next steps. First, valves V₁, V₂ and V₃ were turned on simultaneously for 105, 105 and 15 s (dashed lines in Fig. 1), respectively. Thus, for the first 15 s, the sample solution was directed towards the waste through V₃, thus cleaning the tubing between V₁ and V₃ with the new sample solution, whereas for the next 90 s the sample plug was pumped towards the detection area. Meanwhile, the carrier solution was recirculated to its recipient. Once all the valves were again turned off (solid lines in Fig. 1) and the sample plug reached the photoreactor, placed between V₃ and the detector, the photochemical conversion of piceid into a fluorescent photoproduct took place, and this latter was driven to the detection area, where it was temporarily retained onto the solid support and monitored (257/382 nm, λ_{ex}/λ_{em}). The solid support was regenerated by the carrier solution itself, and the system was prepared for a next sample insertion.

Every sample was inserted in the system in triplicate, and the maximum fluorescence intensity of the peak was used as analytical parameter for quantitative purposes.

Results and discussion

Optimisation of *trans*-piceid extraction

A new extraction procedure was developed to extract *trans*-piceid from cocoa powder and chocolate. Removal of fats and stilbene extraction was carried out by modifying the method previously described by Callemien et al. for the

analysis of stilbenes in hop pellets [21]. Sample clean-up procedures are generally being used to clean up polyphenol extracts prior to further analysis by HPLC [34]. In our case, the stilbene extracts also had to be purified in order to eliminate the aglycon of *trans*-piceid (*trans*-resveratrol), which is also present in cocoa and chocolate [24, 25]. In the working conditions, *trans*-resveratrol was converted into a fluorescent photoproduct, which was also retained on the solid support, Sephadex QAE A-25 (277/382 nm, λ_{ex}/λ_{em}), thus competing with the fluorescent photoproduct from *trans*-piceid for the active sites and giving rise to the spectral overlapping of both compounds. The removal of *trans*-resveratrol was carried out by using SPE on C₁₈ silica gel. Several solvents for the rinsing and elution steps were assayed: water, methanol, ethanol, ethyl acetate and diethyl ether. With this purpose, the washout fractions were monitored with the UV–visible spectrophotometer from 250 to 425 nm. A first rinsing step with water allowed the elimination of most polar compounds from the matrix as sugars. The optimum water volume was studied in the range 2–10 mL and found to be 6 mL. The elution of *trans*-piceid without eluting *trans*-resveratrol was only possible by using aqueous solutions containing different methanol percentages (20% to 50%). A methanol/water (40:20, v/v) solution allowed the elution of a 90% *trans*-piceid. In these conditions, *trans*-resveratrol remained retained on the C₁₈ beads (Fig. 2). The rest of solvents tested did not allow the sequential elution of *trans*-piceid and *trans*-resveratrol.

Preliminary tests of sorption

Piceid shows a very weak fluorescence and is photosensitive. Nevertheless, when aqueous, ethanolic or hydroethanolic *trans*-piceid solutions are UV-irradiated, it is converted first into its *cis*-isomer, which very quickly disappears to lead to the formation of a highly fluorescent photoproduct [33, 35].

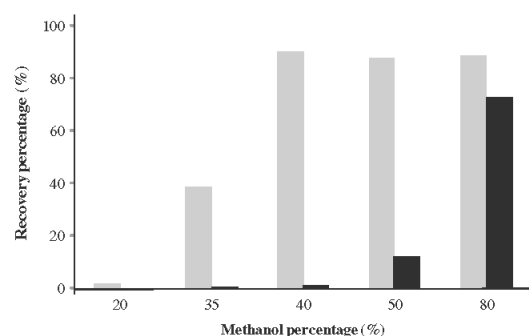


Fig. 2 Recovery percentages in SPE for *trans*-piceid and *trans*-resveratrol, according to the methanol percentage in the eluting solution (methanol/water, v/v). *trans*-Piceid (gray bars), *trans*-resveratrol (black bars); 240 ng mL⁻¹ *trans*-piceid; 240 ng mL⁻¹ *trans*-resveratrol

Therefore, although only *trans*-piceid has been identified in cocoa-containing products [24, 25], the proposed method, based on photo-induced fluorescence, allows the determination of total piceid (*trans*-isomer plus *cis*-isomer).

With the purpose of improving both sensitivity and selectivity in the determination of piceid by measuring the fluorescence of its photoproduct photochemically generated, anion exchangers (Sephadex QAE A-25 and Sephadex DEAE-25), cation exchangers (Sephadex SP C-25 and Sephadex CM C-25) and a non-ionic support (C_{18} silica gel) were tested, at different pH values, to retain this compound. The studies proved that C_{18} silica gel and both anion exchangers allowed the retention of both *trans*-piceid and its photoproduct, Sephadex QAE A-25 being the solid support that, at weakly acidic pH value, provided the maximum analytical signal.

No spectral changes were observed for aqueous *trans*-piceid solutions spectra retained on Sephadex QAE A-25, in the range of pH studied (2.0 to 9.0), showing an excitation maximum at 332 nm and an emission maximum at 392 nm. In the same pH range, the photoproduct of *trans*-piceid presented excitation and emission maxima at 257 and 382, respectively. In both cases, the fluorescence signal was greatly improved by the sorption of *trans*-piceid or its photoproduct on the solid support and their consequent pre-concentration on a little amount of this latter. When comparing the spectra obtained for *trans*-piceid and *trans*-piceid photoproduct solutions in the flow system (Fig. 1) with and without solid support in the flow cell, an improvement in the analytical signal of 12- and 40-fold, respectively, is obtained. Taking into account this enhancement in sensitivity and the complexity of the samples to analyse, the measurement of the photo-induced fluorescence was chosen for the development of the method.

Nature of sample and carrier solutions

pH was shown to be an essential variable since the analytical signal changed significantly with the pH of the sample and carrier solutions. It is necessary to point out that the optimum working pH value will be that providing the maximum conversion of *trans*-piceid in the fluorescent photodegradation product, the maximum fluorescence of the photoproduct generated and the maximum sorption of this latter on the solid support in the detection area.

The study on the influence of pH of the sample was performed by varying it between 2.0 and 9.0, using HNO_3 or NaOH solutions. It was observed that for values above 7.0, signals were not obtained. A drastic decrease in the fluorescence intensity occurs in the narrow range of 5.5–7.0 (Fig. 3). The maximum fluorescence was obtained at pH 5.5. Lower pH values are also traduced in a big decrease in the fluorescence signal. Therefore, a pH value of 5.5 was selected for the next experiments. Several buffer

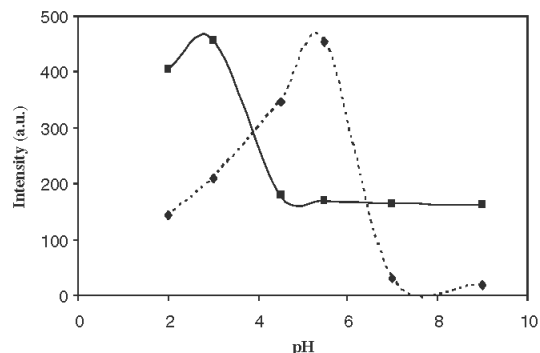


Fig. 3 Influence of pH of the sample (dashed line) and carrier (continuous line) solutions. *trans*-Piceid, 240 ng mL⁻¹; carrier solution, 0.001 mol L⁻¹ HNO₃; irradiation time, 30 s

solutions at pH 5.5 were tested in order to adjust the pH of the sample solution (citric acid/sodium hydroxide; sodium dihydrogen phosphate/sodium hydroxide; sodium acetate/acetic acid), and the best results were achieved by using NaAc/HAc solution. The influence of its concentration on the analytical response was assayed in the range 0.005–0.05 mol L⁻¹, and finally, a 0.02-mol L⁻¹ concentration was chosen for buffering the sample since it provided the best analytical signal. Buffer concentrations below 0.02 mol L⁻¹ originated lower signals. This was attributed to the strong sorption of the photodegradation product of piceid in an area of the solid support placed just above the light beam and to the consequent arrival of a more diluted sample plug to the irradiated area. Higher concentrations caused a lower fluorescence signal too, probably due to the competition between buffer ions and the photodegradation product for the active sites in the ionic solid support.

The influence of pH of the carrier solution was studied by inserting a 240-ng mL⁻¹ piceid solution (pH 5.5) into different aqueous solutions adjusted at pH values ranging from 1.0 to 9.0 with HNO₃ (Fig. 3). The maximum fluorescence signal was obtained at pH 3.0. For pH values higher than 3.0, a drastic decay in the fluorescence signal was obtained, this latter remaining constant and negligible from 4.5 to 9.0. The fluorescence signal also decreased for pH values lower than 3.0, and in addition, overpressure problems were observed due to the compaction of the solid support. Finally, a pH of 3.0 for the carrier solution was chosen as optimum. None of the tested aqueous solutions provided the elution of the photoproduct of *trans*-piceid in a reasonable time.

The introduction of an electrolyte in the carrier solution provided a quicker elution of the *trans*-piceid photoproduct from the solid support, so increasing the throughput. Different electrolytes (NaCl, KCl, NaNO₃, Na₂CO₃) were added to the aqueous carrier solution (pH 3.0) in concen-

trations ranging from 0.01 to 0.2 mol L⁻¹. The best results were obtained when using a 0.06 mol L⁻¹ NaCl concentration (Fig. 4). This solution provided the highest analytical signal, and a rapid and complete elution of the species was monitored, so regenerating completely this one and avoiding the use of an additional eluting solution. Concentrations higher than 0.06 mol L⁻¹ provided a quicker elution of the photoproduct, but they also originated a significant decrease in the analytical signal, probably due to the competition between the species monitored and the electrolyte anions by the active sites of the solid support. Therefore, that concentration was selected as a compromise between analytical signal and peak width. Lower concentrations produced similar analytical signals to that obtained with NaCl 0.06 mol L⁻¹ but wider peaks, decreasing the sampling frequency. The assay of different buffer solutions to adjust the pH of the carrier solution at 3.0 did not provide a significant improvement in the analytical signal or in the time of elution of the photoproduct. Therefore, the carrier solution consisted of 0.06 mol L⁻¹ NaCl/0.001 mol L⁻¹ HNO₃ (pH=3.0).

Taking into account that in multicommutated flow systems there is a very little mixing between both the sample and carrier solutions, the pH of the sample probably primarily influences the photodegradation of *trans*-piceid, whereas the pH of the carrier solution establishes the optimum conditions for the retention of the fluorescent photoproduct on the solid support.

Irradiation time

Irradiation time is, together with pH, a key variable for the generation of fluorescent photoproducts. To establish the optimum irradiation time, a 120 ng mL⁻¹ *trans*-piceid solution was inserted into the system (sampling time, 70 s; flow rate, 1.9 mL min⁻¹), the flow was stopped just when the whole plug of sample was within the photoreactor (440 cm), and the sample was irradiated for increasing periods of time (5 to 70 s). The results showed that the kinetic of photodegradation of *trans*-piceid in the working conditions is very quick. The fluorescence signal increased with the irradiation time to reach a maximum value corresponding to the optimum value of this variable (30 s), and thereafter a decrease in fluorescence intensity was obtained (Fig. 5). The shape of the curve obtained suggests a two-step photolysis mechanism, consisting of the formation of a strongly fluorescent photoproduct and the posterior photodegradation of the latter compound into non-fluorescent product(s). The length of the transport system between the photochemical reactor and the flow cell was the minimum, allowing both units to be connected.

The residence time of *trans*-piceid in the photochemical reactor and, consequently, the irradiation time can be controlled by the flow rate of the carrier solution and/or the

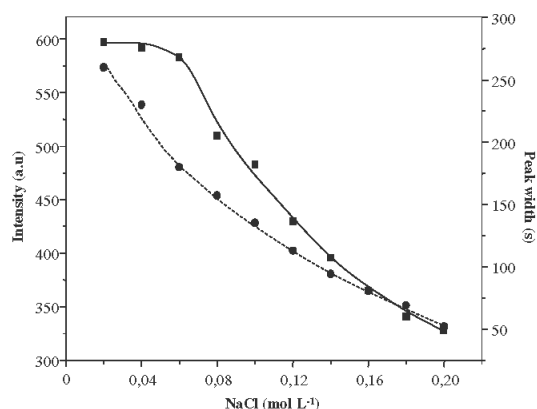


Fig 4 Influence of NaCl concentration in the carrier solution. *trans*-Piceid, 240 ng mL⁻¹; continuous line fluorescence intensity; dashed line peak width

length of the tubing around the lamp. The optimum irradiation time (30 s) was established by using the maximum flow rate allowed by the flow system, 1.9 mL min⁻¹, combined with a 189-cm photoreactor. Longer photoreactor lengths involved higher flow rates and the consequent overpressure problems. Shorter lengths allowed working at lower flow rates, although it caused a significant reduction in throughput, without providing a higher analytical signal. For these latter tests, the sampling time was conveniently varied for providing a same amount of sample.

Sampling time

In flow injection–solid phase systems, it is possible to increase the analytical signal (keeping constant the analyte concentration) by increasing the sample volume injected or, in case of multicommutated systems, by increasing the insertion time of samples. This fact is the consequence of the sorption of higher

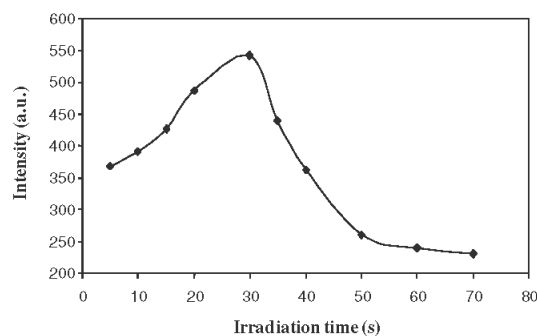


Fig. 5 Influence of irradiation time. *trans*-Piceid, 240 ng mL⁻¹; sampling time, 70 s; flow rate, 1.9 mL min⁻¹; photoreactor length, 440 cm

Table 1 Analytical figures of merit

Parameter	Sample		
	Cocoa powder	Dark chocolate	Milk chocolate
Linear dynamic range/mg kg ⁻¹	1.4–50	1.1–25	0.09–2.0
Calibration graph			
Intercept±σ ^a	44.8±0.5	44.5±0.3	42.6±0.6
Slope±σ ^a (kg mg ⁻¹)	8.0±0.2	14.5±0.4	124±1
Correlation coefficient	0.9993	0.9996	0.9996
Detection limit/mg kg ⁻¹	0.4	0.3	0.03
Quantification limit/mg kg ⁻¹	1.4	1.1	0.09
Relative standard deviation (%)	2.1 ^b	1.8 ^b	3.1 ^b
Throughput (h ⁻¹)	20	20	20

Matrix-matched standard method; 90 s sampling time

^a Standard deviation

^b *trans*-Piceid concentration, 120 ng mL⁻¹; n=5

amount of the species of interest on the solid support, causing an enhancement in the system sensitivity, which could allow the sample dilution in order to reduce matrix effects [36].

The influence of sampling time was tested by inserting into the flow system a 120 ng mL⁻¹ *trans*-piceid solution for sampling times ranging from 5 to 120 s. The fluorescence signal increased linearity until the value of 90 s, whereas higher sampling times did not show a significant increment in the signal. Taking into account that the flow rate and sampling time were established at 1.9 mL min⁻¹ and 90 s, respectively, it corresponded with a sample volume of 2,850 μL, which was finally selected.

Figures of merit

Quantification was carried out by using peak height as analytical signal, and data were fitted by standard least-squares treatment. Analytical parameters are shown in Table 1. A negative matrix effect was noticed, and so, the calibration curves were constructed with matrix-matched standards. With this purpose, increasing volumes of a

standard solution of *trans*-piceid were added to different aliquots of a wine sample before applying the whole analytical procedure on it. International Union of Pure and Applied Chemistry detection [37] and quantification [38] limits were calculated as the average of ten determinations.

Analytical applications

The proposed method was applied to the determination of *trans*-piceid in cocoa powder, dark chocolate and milk chocolate by following the procedure described above. A recovery study at three concentration levels was also performed on the samples analysed, and in all the cases, good recoveries were achieved. The applicability of the proposed method to the analysis of these products was demonstrated by comparison with a reference method [24]. In all the cases, the concentrations found were in good agreement with those obtained by the chromatographic method. The results obtained are shown in Table 2. The analysis of the samples by the reference method allowed to establish that, as previously reported, only the *trans*-isomer of piceid is

Table 2 Determination of *trans*-piceid in cocoa-containing products

Sample	Proposed method		Reference method ^b
	Added (mg kg ⁻¹)	Found±σ ^a (mg kg ⁻¹)	Found±σ ^a (mg kg ⁻¹)
Cocoa powder	0	5.6±0.5	5.9±0.2
	10	15.7±0.9	16.1±0.5
	20	25.3±0.5	26.0±1.1
	40	46.1±0.4	45.6±0.7
Dark chocolate	0	3.0±0.4	2.8±0.4
	10	13.5±0.2	12.5±0.6
	15	18.3±0.3	17.6±1.2
Milk chocolate	0	23.5±1.0	23.0±0.8
	0.8	0.7±0.3	0.8±0.6
	1.2	1.5±1.3	1.4±0.2
	1.8	2.0±0.3	1.9±1.1
		2.4±0.5	2.7±0.9

^a Average of three replicates

^b Reference method [24]

present in cocoa powder and chocolate [24, 25]. Cocoa powder had the highest level of *trans*-piceid (5.6 mg kg⁻¹), followed by dark chocolate (3.0 mg kg⁻¹) and milk chocolate (0.7 mg kg⁻¹). The same pattern has been observed in a previous survey of cocoa-containing products [25].

Conclusions

For the first time, a non-chromatographic method for the analysis of piceid in cocoa powder and chocolate is reported. The highly fluorescent photoproduct generated by on-line photochemical conversion of piceid is strongly retained on an active solid support filling the flow cell, which provides remarkable analytical features such as an enhancement in sensitivity and selectivity, when comparing with conventional photo-induced fluorescence methods. The elimination of the aglycon of piceid, resveratrol, which shows a very similar behaviour in the flow system, is carried out by SPE, selectively eluting piceid from solid support. The implementation of multicommunitation principles contributes with low chemical consumption, simplicity in the handle and an enhancement in reproducibility, as well as a higher sampling throughput. The proposed method can be considered as an interesting alternative to the chromatographic determination of piceid in these food products since it provides higher throughputs and lower cost of instrumentation. In addition, although the proposed fluorimetric method is not able to distinguish between *trans*- and *cis*-piceid, the determination of total piceid overcomes the serious problem present in chromatographic methods due to the risk of photoisomerisation of *trans*-piceid.

Acknowledgements The authors acknowledge the financial support from "Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa" (Junta de Andalucía), Project P07-FQM-02673. L.M.G. also acknowledges research fellowship from Spanish MEC.

References

- Marnett L (2000) *Carcinogenesis* 21:361–370
- Menat É (2006) *Phytothérapie* 4:HS40–HS45
- Pezet R, Pont V, Cuenat P (1994) *J Chromatogr A* 663:191–197
- Bertelli AAE, Giovannini L, Gianessi D, Migliori M, Bernini W, Fregoni M, Bertelli A (1995) *Int J Tissue React* 17:1–3
- Frankel EN, Waterhouse AL, Kinsella JE (1993) *Lancet* 341:1103–1104
- Nakagawa H, Kiyozuka Y, Uemura Y, Senzaki H, Shikata N, Hioki K, Tsubura A (2001) *J Cancer Res Clin Oncol Suppl* 127:258–264
- Fremont L (2000) *Life Sci* 66:663–673
- Ferrero ME, Corsi M, Giovannini L, Bonfrate C, De Caterina R, Tillement JP, Bertelli AAE, Bertelli A (1997) *Int J Tissue React* 19:121–124
- Fabris S, Momo F, Ravagnan G, Stevanato R (2008) *Biophys Chem* 135:76–83
- Karuppagounder SS, Pinto JT, Xu H, Chen HL, Beal MF, Gibson GE (2009) *Neurochem Int* 54:111–118
- Kimura Y, Okuda H, Arachi S (1985) *Biochim Biophys Acta* 834:275–278
- Arichi H, Kimura Y, Okuda H, Baba K, Kozawa M, Arichi S (1982) *Chem Pharm Bull* 30:1766–1770
- Mérillon JM, Fauconneau B, Waffo P, Barrier L, Decendit A, Huguet F (1996) 18th International Conference on Polyphenols; Polyphenols Communications 96, Bordeaux (France), July 15–18, 1996
- Orsini F, Pelizzoni F, Verotta L, Aburjai T (1997) *J Nat Prod* 60:1082–1087
- Kimura Y, Okuda H (2000) *J Pharm Pharmacol* 52:1287–1295
- Hollman PCH, De Vries JHM, Van Leeuwen SD, Mengelers MJB, Katan MB (1995) *Am J Clin Nutr* 62:1276–1282
- Lamuela-Raventós RM, Romero-Pérez AI, Waterhouse AL, De la Torre-Boronat MC (1995) *J Agric Food Chem* 43:281–283
- Caia L, Koziel JA, Dharmadhikarib M, Van Leeuwenc J (2009) *J Chromatogr A* 1216:281–287
- Wang Y, Catana F, Yang Y, Roderick R, Van Breemen RB (2002) *J Agric Food Chem* 50:431–435
- Ibern-Gómez M, Roig-Pérez S, Lamuela-Raventós RM, De la Torre-Boronat MC (2000) *J Agric Food Chem* 48:6352–6354
- Callemien D, Jerkovic V, Rozenberg R, Collin S (2005) *J Agric Food Chem* 53:424–429
- Chena L, Hana Y, Yangb F, Zhangb T (2001) *J Chromatogr A* 907:343–346
- Romero-Pérez AI, Ibern-Gómez M, Lamuela-Raventós RM, De la Torre-Boronat MC (1999) *J Agric Food Chem* 47:1533–1536
- Counet C, Callemien D, Collin S (2006) *Food Chem* 98:649–657
- Hurst WJ, Glinski JA, Miller KB, Apgar J, Davey MH, Stuart DA (2008) *J Agric Food Chem* 56:8374–8378
- Natsume M, Osakabe N, Yamagishi M, Takizawa T, Nakamura T, Miyatake H, Hatano T, Yoshida T (2000) *Biosci Biotechnol Biochem* 64:2581–2587
- Araujo Pimentel F, Nitzke JA, Blauth Klipel C, Vogt de Jong E (2010) *Food Chem* 120:109–112
- Jensen JS, Wertz CF, O'Neill VA (2010) *J Agric Food Chem* 58:1685–1690
- Romero-Pérez AI, Lamuela-Raventós RM, Waterhouse AL, De La Torre-Boronat MC (1996) *J Agric Food Chem* 44:2124–2128
- Montsko G, Pour Nikfardjam MS, Szabo Z, Boddi K, Lorand T, Ohmacht R, Mark L (2008) *J Photochem Photobiol A* 196:44–50
- Reis BF, Gine MF, Zagatto EAG, Lima JLFC, Lapa RA (1994) *Anal Chim Acta* 293:129–138
- Rocha FRP, Reis BF, Zagatto EAG, Lima JLFC, Lapa RAS, Santos JLM (2002) *Anal Chim Acta* 468:119–131
- Roggero JP, García-Parrilla C (1995) *Sci Aliments* 15:411–422
- Wollgast J, Anklam E (2000) *Food Res Int* 33:423–447
- Durán Merás I, Galeano Díaz T, Airado Rodríguez D (2008) *Talanta* 74:675–682
- Ortega Barrales P, Fernández de Córdova ML, Molina Díaz A (1998) *Anal Chim Acta* 376:227–233
- IUPAC (1978) Nomenclature, symbols, units and their usage in spectrochemical analysis II. *Spectrochim Acta B* 33:242–245
- MacDougall D, Crummett WB (1980) Guidelines for data acquisition and data quality evaluation in environmental chemistry. *Anal Chem* 52:2242–2249

**An automatic optosensing device for the simultaneous
determination of resveratrol and piceid in wines**

Analytica Chimica Acta 689 (2011) 226-233



An automatic optosensing device for the simultaneous determination of resveratrol and piceid in wines

Lucía Molina-García, Antonio Ruiz-Medina, María Luisa Fernández-de Córdoba *

Department of Physical and Analytical Chemistry, University of Jaén, Campus Las Lagunillas s/n, 23071 Jaén, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 September 2010

Received in revised form 23 January 2011

Accepted 27 January 2011

Available online 3 February 2011

Keywords:

Resveratrol

Piceid

Multicommutation

Optosensor

Photochemically induced fluorescence

Wine

ABSTRACT

For the first time, a spectrofluorimetric method is reported for the simultaneous determination of resveratrol (RVT) and piceid (PCD), two stilbenes showing diverse interesting physiological and biochemical attributes, as well as a wide range of health benefits ranging from cardioprotection to chemoprevention. The method makes use of a multicommutated flow-through optosensor in which the resolution of RVT and PCD is accomplished by means the sequential arrival of their photoproducts, on-line generated by UV-irradiation, to the detection area. This is possible due to the different kinetic behaviour of these latter on a solid support (C_{18} silica gel) filling a minicolumn placed before the detector. The measurement in solid-phase of the photochemically induced fluorescence of the photoproducts (λ_{exc} : 257 nm/ λ_{em} : 382 nm) is used as analytical signal for monitoring both compounds. The method has been applied to the analysis of RVT and PCD in wines and requires a previous solid-phase extraction (SPE) using Bakerbond C_{18} cartridges. This pretreatment and the use of a solid-support in both the minicolumn and the flow-cell of the detector allow the determination of RVT and PCD by external calibration. Detection limits (DLs) are 9.3 and 12.6 ng mL⁻¹ for RVT and PCD, respectively. Commercial red and white wine samples have been analysed and the results obtained have been satisfactorily validated by high-performance liquid chromatography (HPLC).

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) (RVT) belongs to stilbene family and is one of the widely studied phytochemicals with demonstrated health potential due to its potential preventive activity in several human diseases [1–5]. RVT can also occur in a glycosylated form, called piceid (3,5,4'-trihydroxystilbene-3- β -D-glucoside) (PCD), which has biomedical properties similar to those for RVT [6–8]. RVT and PCD, which exist as both *cis*- and *trans*- isoforms [9], occur naturally in a number of plant families. Dietary sources of RVT and PCD are rather limited, grapes and their derivatives being the main source [10]. RVT is found in the seed and skin of grapes and, hence, in grape juice and wine. RVT occurs free and as its 3- β -D-glucoside, PCD, and their concentrations vary from low μ g L⁻¹ to several mg L⁻¹. Although grapes produce naturally *trans*-isomers of RVT and PCD, during the winemaking process these are partially isomerised to *cis*-isomers [11] and, so, *trans*- and *cis*-isomers of both compounds are found in wines. This isomerisation has been attributed to the light exposure of must or wine during their production process or light exposure of wine bottles

during storage [12]. Concentrations of *trans*-RVT and *trans*-PCD are lower in white than in red wines, which is in agreement with the fact that the skin of grapes is usually macerated together with must during the red winemaking [10,13].

High-performance liquid chromatography (HPLC) in reverse phase is the technique commonly used for the analysis of RVT and PCD in wines, with UV [14], diode array [12], fluorescence [15], electrochemical [16] or mass-spectrometry (MS) [17] detection systems. Other techniques such as gas-chromatography (GC) [18], GC-MS [19], capillary electrophoresis [20] and adsorptive stripping voltammetry [21] have also been reported for the determination of these compounds. Nevertheless, to date only chromatographic methods can be found in literature for the simultaneous determination of both stilbenes. They have been mainly utilized for the measurement of the *trans*-isomers of PCD and RVT, although methods to assay the *cis*-isomers are also available. The problem with these latter is that they are not commercially available at the present time. Although *cis*-isomers can be obtained from *trans*-isomers by exposure to sunlight [22] or to ultraviolet (UV) radiation [23], the rate of isomerisation from *trans*- to *cis*-isomers obtained by these methods is very dependent on experimental conditions [24,25]. Some authors even point out the impossibility of the determination of *cis*-isomers [19]. In conclusion, it can be stated that the widely used photoisomerisation reaction from *trans*- to *cis*-isomers

* Corresponding author. Tel.: +34 953 212166; fax: +34 953 212940.
E-mail address: mferma@ujaen.es (M.L.F.-d. Córdoba).

of RVT and PCD can only be used for quantitative purposes under very well controlled experimental conditions [26].

Fluorescence has been proposed for the determination of PCD and RVT in wines, usually as detection technique in HPLC methods [15]. Nevertheless, spectrofluorimetric methods in the literature are very scarce. To the best of our knowledge, to date only three methods, using photochemically induced fluorescence [27,28] and room temperature synchronous fluorescence [29], have been reported. These methods only allow the individual determination of PCD or RVT (*trans*-isomer or *trans*- plus *cis*-isomer).

The aim of the present work was to develop a new multicommutated flow-injection (FI) fluorimetric method for the simultaneous determination of both PCD and RVT in wines, that is, with only one sample injection. The method is based on the on-line generation of fluorescent photoproducts from PCD and RVT by UV-irradiation and their monitoring when sorbed on C_{18} silica gel in the detection area. The simultaneous determination of both stilbenes is possible by means of the use of a minicolumn placed in the flow-system and filled with an appropriate solid-support. The different kinetic behaviour of the photoproducts of PCD and RVT on this latter allows their sequential arrival to the detection area. Multicommutation principles [30] are also exploited in the flow-system in order to allow both independent handling of sample and carrier solutions and the complete automation of the process with low sample and reagent consumption. The measurement of the fluorescence in solid-phase provides a significant improvement in both sensitivity and selectivity, when comparing with that one in homogeneous solution. This is the first spectrofluorimetric method proposed for the simultaneous determination of RVT and PCD. For both stilbenes, the generation of the same fluorescent photoproducts from the *cis*- or *trans*-isomer allows the determination of their total amount (*cis*- plus *trans*-isomers) in real samples. Therefore, the proposed method overcomes the limitations of chromatographic methods, such as the risk of photoisomerisation of *trans*- to *cis*-isomer, which makes necessary conducting all procedures in low light environments to minimize light-induced degradation, and the above mentioned non-availability of commercial standards for *cis*-isomers. In addition, although sensitivity and throughput are similar to those obtained in HPLC methods, the proposed method offers new opportunities for determining RVT and PCD by using low-cost equipment. It has been applied satisfactorily to the simultaneous determination of PCD and RVT in red and white wines. No matrix effect was observed in the analysed samples.

2. Experimental

2.1. Instrumentation, apparatus and manifold

A Cary-Eclipse spectrofluorimeter (Varian Inc., Mulgrave, Australia), fitted with the Cary Eclipse software package, was used for spectra acquisition and fluorescence measurements at 382 nm (λ_{ex} : 257 nm). Excitation and emission slits were set at 10 and 10 nm, respectively, and the voltage of the photomultiplier at 590 V. The spectrofluorimeter was furnished with a Hellma (Müllheim, Baden, Germany) 176.752 QS flow-through cell (25 μ L inner volume, 1.5 mm optical length) packed with C_{18} silica gel. All the measurements were carried out at room temperature.

The flow manifold used is shown in Fig. 1. It was built with a four-channel Gilson Minipuls-3 peristaltic pump (Villiers le Bell, France), fitted with a rate selector and methanol resistant (Tygon) pump tubes type Solvflex (Elkay Products, Shrewsbury, MA, USA). Five 161T031 NResearch three-way solenoid valves (Neptune Research, MA, USA) controlled by an electronic interface, based on ULN 2803 integrate circuits, and operated at 12 V electric potential and

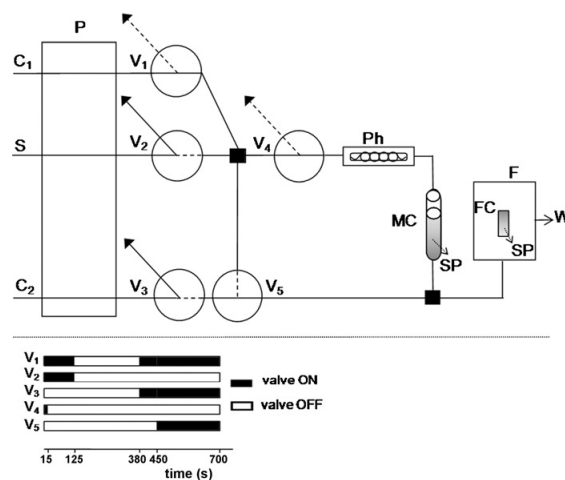


Fig. 1. Schematic diagram for flow-injection assembly. S, sample; C₁, carrier solution 1 (20% methanol); C₂, carrier solution 2 (45% methanol); P, peristaltic pump; V₁, V₂, V₃, V₄ and V₅, three-ways solenoid valves; Ph, photoreactor; MC, minicolumn; F, spectrofluorimeter; FC, flow-cell; SP (silica gel C_{18}); W, waste. For each solenoid valve, the solid and dotted lines refer to "OFF" and "ON" positions, respectively. Flow-rate: 1.1 mL min⁻¹. The scheme manifold shows the valve time program (sampling time, 125 s).

100 mA direct current were also used. The software for controlling the system was developed in Visual Basic 6.0 by our research group. The different parts of the flow-system were connected with PTFE tubing (0.8 mm i.d.) and methacrylate connections. The on-line photochemical conversion of RVT and PCD was carried out by using a home-made photoreactor, which was prepared by loosely coiling a 92 cm PTFE tubing (0.8 mm i.d.) around a low pressure mercury lamp (15 W, 254 nm). The UV lamp was placed in an aluminium box for the maximum light reflection and heat dissipation, not being necessary the use of a cooling device. The photoreactor was placed between V₄ and the minicolumn (Fig. 1). This latter was made in glass (internal diameter, 6 mm; length, 6 cm) and was filled with C_{18} silica gel (120 mg). Both the minicolumn and flow-cell were loaded with the solid support, as methanol slurry, with the aid of the peristaltic pump. The outlets were plugged with glass wool to prevent the resin beads displacement by the carrier stream. The minicolumn was filled with the minimum amount of solid support which allowed the complete separation of both analytes, whereas the flow-cell was filled just up to a height which enabled the light beam to pass completely through the solid layer. With higher levels, the analyte preconcentration took place on the upper part of the solid support, just over the area irradiated by the excitation beam, getting lower and wider signals. On the other hand, with lower solid support levels the light beam passed completely or partially through the solution and, consequently, a decrease in the signal was obtained. Therefore, the top of the support was kept as close as possible to the light beam.

A vacuum system 12-port Visiprep SPE Vacuum Manifold (Supelco, Bellefonte, PA) for SPE procedure, a Selecta Ultrasons ultrasonic bath (Barcelona, Spain) and a Crison Model 2002 pH-meter with a glass/saturated calomel combination electrode (Crison, Barcelona, Spain) were also used.

2.2. Reagents and solutions

All reagents were analytical reagent grade and Milli-Q (Millipore, Bedford, MA) water was used throughout.

trans-RVT and *trans*-PCD (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) stock solutions of 200 mg L⁻¹ each one, were prepared by dissolving the appropriate amount in ethanol (Panreac, Barcelona, Spain). They were kept away from light with an aluminium foil and stored at 4 °C in a refrigerator, remaining stable for at least four weeks. Working standard solutions were prepared daily by taking an aliquot of the stock solution and diluting with 0.04 mol L⁻¹ NaCH₃COO/HCH₃COO (NaAc/HAc) buffer solution, pH = 5.5. The working solutions were stable for at least 8 h, when protected from light, which was enough to make the daily experiments.

Carrier solutions 1 and 2 (20 and 45% methanol (*v/v*), respectively) were prepared by dissolving the required volume of methanol in water. C₁₈ bonded phase silica gel beads (55–105 μm average particle size) (Waters, Milford, MA, USA) were used as active solid support both in the detection area and the minicolumn. Cation and anion-exchangers (Sephadex SP C-25, Sephadex CM C-25, Sephadex QAE A-25 and Sephadex DEAE A-25, all of them having 40–120 μm average particle size) (Sigma, Alcobendas, Madrid, Spain) were also tested for the retention of RVT, PCD and their photoproducts.

Methanol, ethanol, nitric acid, ethyl acetate and diethyl ether were obtained from Panreac. Octadecyl (C₁₈) Bakerbond SPE cartridges of 6 mL with 500 mg of packing material (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA) were also used for solid-phase extraction (SPE) procedure.

2.3. Sample preparation

Several commercial red and white wines were purchased of local markets and stored in darkness at 4 °C. Along all the process, the samples were protected from light.

C₁₈ cartridges were previously activated with 3 mL of methanol and flushed with 6 mL of water. An aliquot of 10 mL of wine was loaded onto the cartridge at a flow-rate of 3–4 mL min⁻¹. Then, the cartridge was rinsed with 6 mL of water and dried under vacuum. Finally, the elution of RVT and PCD was carried out with 2 mL of methanol three times and the eluate was evaporated to dryness under a gentle stream of nitrogen at room temperature. The final residue was reconstituted to 10 mL with 0.04 mol L⁻¹ NaAc/HAc buffer solution (pH 5.5).

2.4. Procedure

In the initial status, being all the valves switched off, the UV lamp and the peristaltic pump are turned on. Thus, the carrier solution 1 flows through the system (Fig. 1) to the detector whereas the sample solution and the carrier solution 2 are recycled to their vessels until a stable baseline is recorded. Then the determination of RVT and PCD is performed by following the next procedure:

Step 1 (from 0 to 125 s). V₁ and V₂ are switched on for 125 s and V₄ for 15 s. This way, the sample solution goes to the waste through V₄ for the first 15 s, so cleaning the portion of tubing between V₄ and V₁ with the new sample solution. For the next 110 s, the sample solution flows through V₄, passes through the photoreactor and reaches the minicolumn, in which the photoproducts of RVT and PCD are temporarily retained. During this step, carrier solution 1 is recycled to its recipient. Step 2 (from 125 to 380 s). All the valves remain switched off for 255 s. This way, the carrier solution 1 flows again through the system and propels the sample solution to pass through the minicolumn and reach the detector. The photoproducts of PCD are then temporarily retained on the solid support in the detection area and monitored, whereas the photoproduct of RVT still remains retained in the minicolumn. Step 3 (from 380 to 700 s). V₁ and V₃ are activated for 320 s, so allowing the circulation of the carrier solution 2 through the system. During the first 70 s this solution flows directly to the detector and, consequently, the

photoproducts of PCD are rapidly eluted from the solid support and the baseline is recovered. During the next 250 s, and by means of the activation of V₅, the carrier solution 2 circulates now through the minicolumn, so originating the rapid elution of the photoproduct of RVT from this latter, its arrival to the detection area and its monitoring.

The experiments were performed in triplicate and the maximum fluorescence intensity of the peak was used as analytical parameter for quantitative purposes.

3. Results and discussion

3.1. Optimisation of SPE procedure

The complexity of the wine matrix usually makes necessary to carry out a previous clean-up step before the analysis of RVT and PCD. In the proposed method, the fluorescent photoproducts generated from RVT and PCD are retained on a solid support before the measurement of their analytical signals, so excluding a lot of organic species accompanying the target compounds. Nevertheless, a very important matrix effect was observed. SPE was chosen for the extraction of RVT and PCD from wine due to its widespread use in control laboratories and to the satisfactory recovery percentages obtained with this technique in previous tests performed in our laboratory for the analysis of both compounds in other matrices. Optimisation of SPE working conditions was carried out by using commercial samples of red and white wines. The washout fractions were monitored with an UV–visible spectrophotometer from 250 to 425 nm.

First, the amount of water necessary to eliminate the most polar compounds of wine, such as sugars, without eluting RVT and PCD was determined. The optimal volume of water was studied in the range of 1–10 mL and found to be 6 mL. It was checked that no analyte was lost in this step of the procedure. Then, three different solvents usually used in SPE of stilbenes were assayed for the elution step: methanol, ethyl acetate and diethyl ether. Methanol was selected since it provided the best recoveries for both RVT and PCD and there was no interference from other matrix components in the analysis of the extracts. The extraction recovery was determined as the ratio between the slopes of the calibration curve and a calibration curve constructed with standards previously subjected to the whole SPE procedure. It resulted to be 85 and 88% for RVT and PCD, respectively.

Some authors have demonstrated the denaturing effects of vacuum rotary evaporation on RVT and PCD [31]. Therefore, the elimination of the eluting solvent was carried out under nitrogen. Under these evaporation conditions no degradation of RVT or PCD occurred.

No matrix effect was observed by following the SPE procedure developed.

3.2. Preliminary study

3.2.1. Sensitivity improvement by UV irradiation

trans-RVT and *trans*-PCD show a weak fluorescence and are photosensitive. Nevertheless, the intense UV irradiation of aqueous, ethanolic or hydroethanolic *trans*-RVT and *trans*-PCD solutions originates their conversion first in the corresponding *cis*-isomer, which very quickly disappears to lead to the formation of highly fluorescent photoproducts [27,28,32]. Then, the total (*trans*-isomer plus *cis*-isomer) RVT or PCD determination in a sample is possible by measuring the fluorescence of the photoproducts generated from *trans*-isomers after UV irradiation [27,28]. Fig. 2 shows the fluorescence spectra for *trans*-RVT and *trans*-PCD obtained before and after UV irradiation in homogeneous solution. As can be seen, the

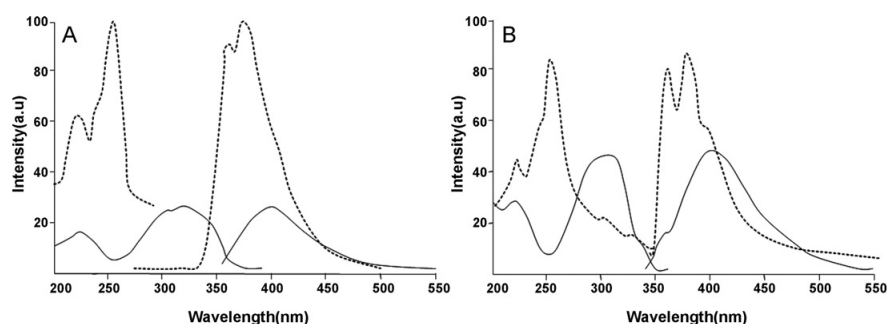


Fig. 2. Fluorescence spectra of *trans*-RVT and *trans*-PCD in homogeneous solution. (A) Excitation and emission spectra for *trans*-RVT before irradiation (continuous line; $5 \mu\text{g mL}^{-1}$; $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$, 322/403 nm) and after irradiation (dashed line; $2 \mu\text{g mL}^{-1}$; $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$, 257/382 nm). (B) Excitation and emission spectra for *trans*-PCD before irradiation (continuous line; $6 \mu\text{g mL}^{-1}$; $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$, 315/407 nm) and after irradiation (dashed line; $2 \mu\text{g mL}^{-1}$; $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$, 257/382 nm), pH 5.5.

measurement of photochemically induced fluorescence originates a significant improvement in the analytical signal (10- and 5-fold for *trans*-RVT and *trans*-PCD, respectively) when comparing with the measurement of the native fluorescence. Therefore, the former was chosen for the development of the optosensing device.

3.2.2. Tests of sorption

With the purpose of testing the possibility of separating PCD and RVT in the flow-system by means of the insertion of a minicolumn filled with an appropriate solid support, several tests of sorption of both compounds and their photoproducts were carried out. The flow manifold used for these tests included two valves for the insertion of the sample and carrier solutions, a photoreactor, a minicolumn and a flow-cell, being these two latter elements filled with a solid support. The resins assayed were anion-exchangers (Sephadex QAE A-25 and Sephadex DEAE-25), cation-exchangers (Sephadex SP C-25 and Sephadex CM C-25) and non-ionic supports (C_{18} silica gel). The assays proved that both C_{18} silica gel and anion-exchangers allowed the retention of *trans*-RVT, *trans*-PCD and their photoproducts, but only when using C_{18} silica gel a different kinetic behaviour was observed. Nevertheless, exclusively in the case of the photoproducts this difference was sufficient as to allow their sequential arrival to the detector. The fluorescent photoproducts were transiently retained on C_{18} silica gel, but the photoproduct of *trans*-RVT reached the detector after the photoproduct of *trans*-PCD. Therefore, the use of a minicolumn, filled with C_{18} silica gel and placed after the photoreactor, would make possible the simultaneous determination of RVT and PCD with only one sample injection. In addition, the measurement of the fluorescence of the on-line generated photoproducts once retained on this same solid-support in the flow-cell would allow an improvement in sensitivity and selectivity. Consequently, the manifold shown in

Fig. 1 was designed. The filling of the flow-cell with an additional amount of solid support was also tested for the separation of RVT and PCD without the need of using a minicolumn, but it did not result.

No spectral changes were observed for aqueous solutions of the photoproducts retained on C_{18} silica gel, in the range of pH studied (2.0–7.0), showing excitation/emission maxima at 257/382 and 277/382 nm for the photoproducts of *trans*-PCD and *trans*-RVT, respectively (Fig. 3). As can be seen, the spectral overlapping makes impossible their simultaneous determination without a previous separation. Taking into account that sensitivity for the determination of PCD was lower than that for the determination of RVT, 257/382 nm ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$) were chosen as working wavelengths for further experiments. The selection of these latter measurement wavelengths implied a decrease in the fluorescence signal of the photoproduct of *trans*-RVT of 8%. On the other hand, the measurement of the fluorescence at 277/382 nm would have implied a reduction in the analytical signal of the photoproduct of *trans*-PCD of 25%. In both cases, the sorption of the photoproducts on the solid support provided an important improvement in the analytical signal when comparing to that obtained in homogeneous solution under the same working conditions (8- and 12-fold for *trans*-PCD and *trans*-RVT photoproducts, respectively). This was due to the preconcentration of the photoproducts on a little amount of solid support in the detection area.

3.3. Study of the variables influencing the separation of RVT and PCD

With the purpose of discriminating sufficiently in the time the analytical signals of the photoproducts of PCD and RVT as to allow their simultaneous determination, it was necessary studying the

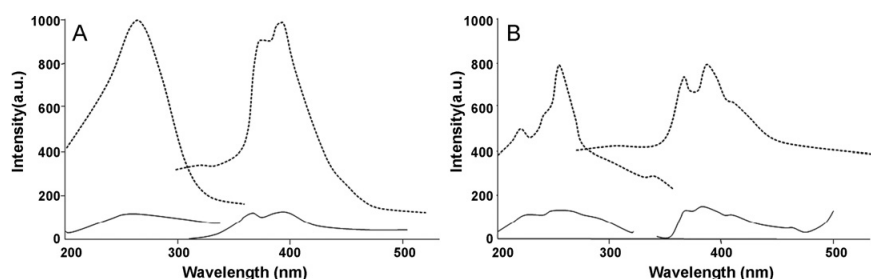


Fig. 3. Fluorescence spectra of the photoproducts of: (A) *trans*-RVT and (B) *trans*-PCD. Excitation and emission spectra in homogeneous solution (continuous line) and on C_{18} silica gel (dashed line). $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ *trans*-RVT or *trans*-PCD (in solution); $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ *trans*-RVT or *trans*-PCD (in solid phase); pH 5.5; 25 s irradiation time.

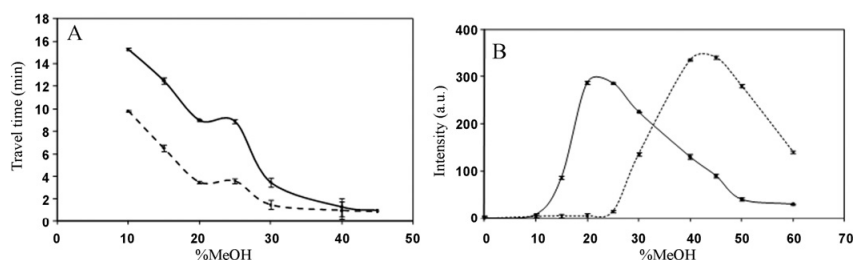


Fig. 4. Influence of the methanol percentage in the carrier solution on (A) the travel times of FI-peaks for the photoproduct of *trans*-PCD (dashed line) and *trans*-RVT (continuous line) and (B) the fluorescence intensity (at 380 s after the sample injection). 120 mg of C_{18} silica gel; *trans*-PCD and *trans*-RVT concentrations, $1 \mu\text{g mL}^{-1}$.

nature of the carrier solution and the amount of solid support in the minicolumn.

3.3.1. Investigation of the carrier solution

Taking into account the non-polar character of the solid support employed (C_{18}), several carrier solutions containing methanol and water in different proportions (10–45%, v/v) were tested and the time elapsed between the insertion of the sample in the flow-system and the appearance of the FI-peak (travel time) was measured for the photoproducts of *trans*-RVT and *trans*-PCD. As shown in Fig. 4A, in both cases the travel time decreases as the methanol concentration in the carrier solution increases, up to a 40% concentration. On the other hand, the difference between the travel times for FI-peaks of the photoproducts of *trans*-RVT and *trans*-PCD is significant and equal for methanol concentrations below 30%. In this range of methanol concentrations, 20 and 25% provided the highest throughput.

After this, a similar experiment was carried out with purpose of studying the influence of the methanol concentration in the carrier solution on the fluorescence intensity. The analytical signal was measured just at the time corresponding to the maximum of the FI-peak of the photoproduct of *trans*-PCD obtained in the previous experiment for 20 or 25% methanol concentrations (380 s). As can be seen in Fig. 4B, 20 and 25% methanol concentrations also provided the highest analytical signal in the determination of PCD, decreasing this latter for higher and lower methanol concentrations. Finally, the methanol concentration in the carrier solution was established at 20% (v/v) (see carrier solution 1 in Fig. 1).

The carrier solution 1 (20% methanol) originated a transitory retention of the photoproducts of *trans*-PCD and *trans*-RVT on the

solid support in the detection area, also acting as eluting solution. Nevertheless, the elution of the photoproduct of *trans*-PCD was not sufficiently quick as to allow the recovering of the baseline before the arrival of the photoproduct of *trans*-RVT to the detection area, and an overlapping of both analytical signals was obtained. This can be seen in Fig. 5A. With the purpose of providing a quicker elution of the photoproduct of *trans*-PCD from the active solid support, a new carrier solution consisting of 45% methanol was introduced in the flow-system (carrier solution 2 in Fig. 1). This solution flowed through the system when valve V_3 was "ON", without passing through the minicolumn, so avoiding the arrival of the photoproduct of *trans*-RVT to the detection area before the complete elution of that of PCD, which took around 70 s. The optimal time for the insertion of this solution was studied between 345 and 395 s. A time of 380 s was selected since allowed the separation of the analytical signals of the photoproducts of *trans*-RVT and *trans*-PCD and the highest fluorescence intensity for the latter (Fig. 5B). Later, in order to provide also a rapid elution of the photoproduct of *trans*-RVT from the minicolumn, the same carrier solution 2 (45% methanol) was inserted in the system again but passing now through the minicolumn. This was possible by activating V_5 during 250 s and maintaining activated V_3 during the same time. Therefore, V_3 remained activated a total time of 320 s.

3.3.2. Amount of solid support in the minicolumn

As above described, both the minicolumn and the flow-cell were filled with the same solid support, C_{18} silica gel. With the aim of getting the complete separation of the photoproducts of *trans*-RVT and *trans*-PCD, the amount of silica gel C_{18} in the minicolumn, and consequently the length of the solid support filling this latter, was

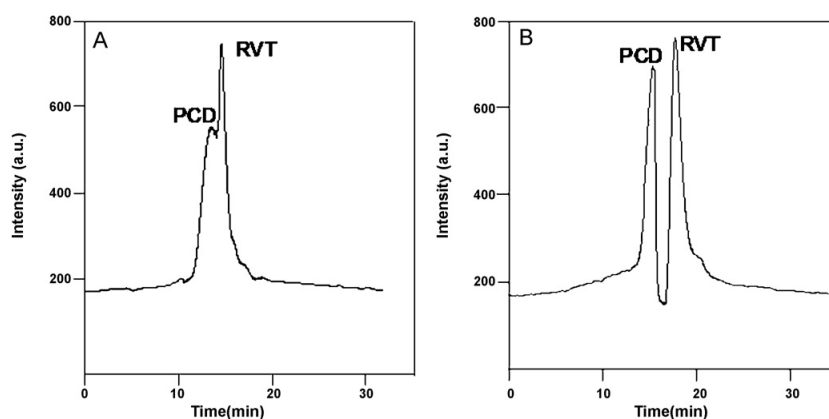


Fig. 5. Recorded analytical signals for the photoproducts of *trans*-PCD and *trans*-RVT: (A) with 20% methanol as carrier solution 1 and (B) with 20% methanol as carrier solution 1 and inserting 45% methanol as carrier solution 2 at 380 s. 120 mg of C_{18} silica gel; *trans*-PCD and *trans*-RVT concentrations, $1 \mu\text{g mL}^{-1}$.

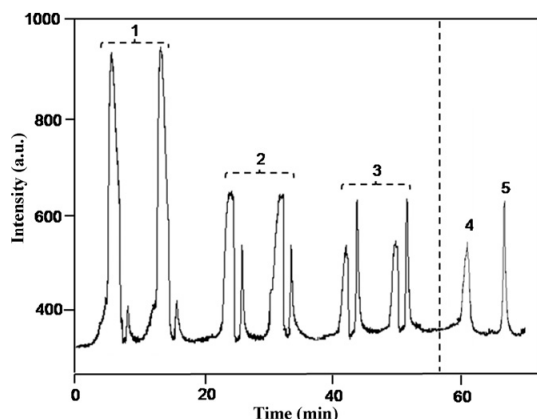


Fig. 6. Influence of the amount of solid support in the minicolumn: (1) $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ *trans*-PCD and *trans*-RVT solution, 25 mg of C_{18} silica gel; (2) $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ *trans*-PCD and *trans*-RVT solution, 60 mg of C_{18} silica gel; (3) $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ *trans*-PCD and *trans*-RVT solution, 120 mg of C_{18} silica gel; (4) $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ *trans*-PCD standard solution, without column; (5) $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ *trans*-RVT standard solution, without column. In 1, 2 and 3, the first and second FI-peaks correspond to *trans*-PCD and *trans*-RVT, respectively.

tested between 25 and 130 mg (1 and 4 cm, respectively). The study was carried out by injecting in the system 2146 μL of a solution containing $1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ of *trans*-PCD and *trans*-RVT. As shown in Fig. 6, for amounts of resin below 120 mg an overlapping of the fluorescence signals of the photoproducts was obtained. This can be checked by comparing their maximum fluorescence intensities with the corresponding *trans*-RVT and *trans*-PCD standard solutions. Therefore, the minicolumn was filled with this amount of resin. Higher amounts of resin originated lower sampling frequencies and overpressure problems in the flow system.

3.4. Irradiation time

Irradiation time is, together with pH, a key variable for the generation of fluorescent photoproducts. To establish the optimal irradiation time, $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ *trans*-RVT or *trans*-PCD solutions were inserted in the system (sampling time, 125 s; flow-rate, 1.1 mL min^{-1}), the flow was stopped just when the whole plug of sample was within the photoreactor (460 cm) and the sample was irradiated for increasing periods of time (5–40 s). The results showed that the kinetic of photo-degradation of both compounds in the working conditions is very quick. The fluorescence signal increased with the irradiation time up to reach a maximum value corresponding to the optimal value of this variable (20 s for *trans*-RVT y 25 s for *trans*-PCD) and thereafter a decrease in fluorescence intensity was obtained (Fig. 7). The shape of the curve obtained suggests a two-step photolysis mechanism, consisting of the formation of a strongly fluorescent photoproduct and the posterior photodegradation of the latter compound into non-fluorescent product(s). An irradiation time of 25 s was chosen for next experiments, which implied a decrease in the analytical signal of the *trans*-PCD photoproduct of 14%.

The residence time of *trans*-RVT and *trans*-PCD in the photochemical reactor and, consequently, the irradiation time can be controlled by the flow-rate of the carrier solution and/or the length of the tubing around the lamp. The optimal irradiation time was established by using the maximum flow-rate allowed by the flow-system, 1.1 mL min^{-1} , combined with a 92 cm photoreactor. Longer

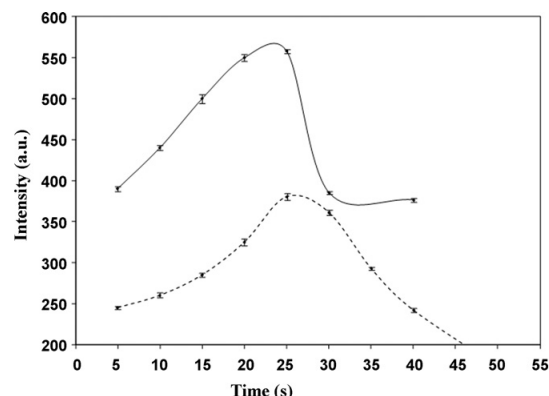


Fig. 7. Influence of irradiation time for *trans*-PCD (dashed line) and *trans*-RVT (continuous line). Sampling time, 125 s; flow-rate, 1.1 mL min^{-1} ; photoreactor length, 460 cm; *trans*-PCD and *trans*-RVT concentrations, $1 \mu\text{g mL}^{-1}$.

photoreactor lengths involved higher flow-rates and the consequent overpressure problems. Shorter lengths allowed working at lower flow-rates although it caused a significant reduction in throughput, without providing a higher analytical signal. For these latter tests, the sampling time was conveniently varied for providing a same amount of sample.

3.5. Investigation of pH value of the sample

As it is well known, the pH of sample is a critical variable for the generation of fluorescent photoproducts from a compound after UV irradiation. Besides, taking into account that the analytical signal is measured on a solid-phase, the optimal working pH is which provides not only the maximum photoconversion of analyte into a fluorescent photoproduct but also the maximum sorption of this latter on the solid support. In order to optimise this variable, standard solutions with constant *trans*-PCD and *trans*-RVT concentrations and different pH values (from 2.0 to 7.0) were injected in the flow-system and their analytical signals were recorded. No significant variations in the fluorescence signals of the photoproducts were observed in this pH range. These results were expected since, as previously reported [27,28], *trans*-RVT and *trans*-PCD neutral species are the predominant ones in acid and neutral media and no changes in their UV and fluorescence spectra are observed. Nevertheless, for a pH of 5.5 a slightly greater difference between the travel times of the FI-peaks for the photoproducts of *trans*-RVT and *trans*-PCD was obtained and, consequently, this pH value was selected for further experiments.

Several buffer solutions at pH 5.5 were tested in order to adjust the sample solution (citric acid/sodium hydroxide; sodium dihydrogen phosphate/sodium hydroxide; sodium acetate/acetic acid)

Table 1
Analytical parameters.

Parameter	RVT	PCD
Linear dynamic range/ $\mu\text{g mL}^{-1}$	0.03–1.0	0.04–1.0
Calibration graph		
Intercept	16.5 ± 0.4	20.8 ± 0.6
Slope ($\text{mL } \mu\text{g}^{-1}$)	538.9 ± 0.5	352.3 ± 0.9
Correlation coefficient	1	0.9997
Detection limit/ $\mu\text{g L}^{-1}$	9.3	12.6
Quantitation limit/ $\mu\text{g L}^{-1}$	31	42
RSD (%) ($n = 10$)	4.1 ^a	3.8 ^a
Sampling frequency/ h^{-1}	5	5

^a *trans*-RVT and *trans*-PCD concentration, $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Table 2
Determination of PCD and RVT in wines.

Sample	Proposed method				Reference method ^a	
	Added ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		Found $\pm \sigma^b$ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		Found $\pm \sigma^b$ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	
	PCD	RVT	PCD	RVT	PCD	RVT
Red wine 1	0.00	0.00	0.66 \pm 0.04	0.22 \pm 0.03	0.68 \pm 0.02	0.23 \pm 0.10
	0.25	0.25	0.95 \pm 0.03	0.46 \pm 0.01	–	–
	0.50	0.50	1.13 \pm 0.05	0.71 \pm 0.05	–	–
Red wine 2	0.00	0.00	0.81 \pm 0.07	0.43 \pm 0.05	0.84 \pm 0.07	0.41 \pm 0.05
	0.25	0.25	1.03 \pm 0.05	0.69 \pm 0.05	–	–
	0.50	0.50	1.35 \pm 0.07	0.93 \pm 0.06	–	–
White wine 1	0.00	0.00	0.24 \pm 0.04	0.09 \pm 0.07	0.23 \pm 0.06	0.09 \pm 0.13
	0.10	0.10	0.35 \pm 0.03	0.19 \pm 0.04	–	–
	0.30	0.30	0.52 \pm 0.10	0.38 \pm 0.05	–	–
White wine 2	0.00	0.00	0.18 \pm 0.07	0.10 \pm 0.12	0.20 \pm 0.06	0.09 \pm 0.07
	0.10	0.10	0.30 \pm 0.05	0.19 \pm 0.06	–	–
	0.30	0.30	0.46 \pm 0.10	0.41 \pm 0.08	–	–

^a Ref. [22].

^b Standard deviation ($n = 3$).

and the best results were achieved by using NaAc/HAc buffer. The influence of its concentration on the analytical response was assayed in the range 0.005–0.06 mol L⁻¹. Finally, a 0.04 mol L⁻¹ concentration was chosen for buffering the sample since it provided an improvement in the fluorescence intensity of 20 and 30% for *trans*-PCD and *trans*-RVT, respectively, when comparing with using an aqueous solution.

3.6. Sampling time

In flow-through sensors is possible to improve sensitivity by only increasing the sample volume inserted in the system. This effect is a consequence of the sorption on a constant amount of solid support on increasing amounts of analyte in the detection area. This effect also allows working in a wider concentration range and makes possible to reduce the matrix effect by performing only an appropriate dilution of sample. However, it is also necessary to take into account that the increase of the sample volume entails a simultaneous increase in time of analysis and, consequently, both sensitivity and throughput have to be considered in the optimisation of this parameter.

In a multicommutated system sample volume can be controlled by varying the sampling time. With the purpose of studying this variable, a 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ *trans*-PCD and *trans*-RVT solution was inserted in the system for increasing periods of time (range 40–140 s) and the fluorescence signals were recorded. In both cases, the analytical signals increased up to 125 s and then they remained constant. This sampling time, which corresponds to a volume sample of 2146 μL , was selected for next experiments.

3.7. Method validation

The existence of matrix effect was evaluated by comparing the slopes of aqueous standards and standard addition calibration graphs for different wine samples. Since there were no statistically significant differences between them for *trans*-RVT and *trans*-PCD, it was concluded that there was no matrix effect. Therefore, the determination of RVT and PCD in wines was carried out by using external calibration. In the above described optimal working conditions, calibration graphs were established for each stilbene after inserting in the flow-system standard solutions in triplicate. Data were fitted by standard least squares treatment. The standard deviation of both intercept and slope was calculated. The results are summarised in Table 1.

The IUPAC detection and quantification limits were estimated as the concentration of analyte which produced a fluorescence signal equal to 3 and 10 times the standard deviation of the background fluorescence, respectively. This standard deviation was determined by injecting 10 times the blank solution. Repeatability was determined by 10 independent replicate analyses on solutions containing 0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of both stilbenes.

3.8. Analysis of wine samples and recovery assay

With the aim of showing the usefulness of the proposed method it was applied to the simultaneous determination of RVT and PCD in red and white wine samples. Results of wine analysis taking into account the extraction recoveries are shown in Table 2. They were satisfactorily validated by a reference method. In addition a recovery assay was carried out. Recoveries were estimated on the basis of determination after spiking the samples with two different known concentrations of *trans*-RVT and *trans*-PCD. The proposed method showed recoveries for RVT and PCD near 100%. In all the cases, the amount of PCD found in both red and white wine was higher than that of RVT. On the other hand, the amount of both stilbenes in white wine was lower than that in red wine.

4. Conclusions

In this paper a flow-through optosensor, combined with photochemically induced fluorescence detection, is proposed for the determination of binary mixtures of PCD and RVT in wine. To date, it is the first spectrofluorimetric method reported for the simultaneous determination of RVT and PCD. The determination of the total amount of both stilbenes (*cis*- plus *trans*-isomer) overcomes the problems present in chromatographic methods due to the risk of photoisomerisation of *trans*- to *cis*-isomers during the analysis and the non-availability of commercial *cis*-PCD and *cis*-RVT standards. The resolution of the components of the mixture is based on the different kinetics of retention/elution of their fluorescent photoproducts, generated on-line, on an appropriate solid support filling minicolumn placed before the flow-cell. The proposed method offers the possibility of a rapid determination of RVT and PCD in wines, using low-cost equipment. Sample clean-up with C₁₈ cartridges allows the determination of both stilbenes by external calibration, so improving simplicity of the method. The implementation of multicommutation principles also contributes with low chemicals consumption, simplicity in the handle and an enhancement in reproducibility, as well as a higher sampling throughput.

References

- [1] L.A. Stivala, M. Savio, F. Carafoli, P. Perucca, L. Bianchi, G. Maga, L. Forti, U.M. Pagnoni, A. Albini, E. Prosperi, V. Vannini, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 22586–22594.
- [2] S. Shankar, G. Singh, R.K. Srivastava, *Front. Biosci.* 12 (2007) 4839–4854.
- [3] Z. Wang, Y. Huang, J. Zou, K. Cao, Y. Xu, J.M. Wu, *Int. J. Mol. Med.* 9 (2002) 77–79.
- [4] S. Shigematsu, S. Ishida, M. Hara, N. Takahashi, H. Yoshimatsu, T. Sakata, R.J. Korhuit, *Free Radic. Biol. Med.* 34 (2003) 810–817.
- [5] S.A. Faith, T.J. Sweet, E. Bailey, T. Booth, J.J. Docherty, *Antiviral Res.* 72 (2006) 242–251.
- [6] Y. Kimura, H. Okuda, *J. Pharm. Pharmacol.* 52 (2000) 1287–1295.
- [7] C.W. Shan, S.Q. Yang, H.D. He, S.L. Shao, P.W. Zhang, *Acta Pharmacol. Sin.* 11 (1990) 527–530.
- [8] C. Rivière, J.C. Delaunay, F. Immel, C. Cullin, J.P. Monti, *Neurochem. Res.* 34 (2009) 1120–1128.
- [9] M. Sato, Y. Suzuki, T. Okuda, K. Yokotsuka, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 61 (1997) 1800–1805.
- [10] M.T. Ribeiro De Lima, P. Waffo-Téguo, P.L. Teissedre, A. Pujolas, J. Vercauteren, J.C. Cabanis, J.M. Méillon, *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999) 2666–2670.
- [11] G.J. Soleas, D.M. Goldberg, E.P. Diamandis, A. Karumanchiri, J. Yan, E. Ng, *Am. J. Enol. Vitic.* 46 (1995) 346–352.
- [12] R.M. Lamuela-Raventós, A.I. Romero-Pérez, A.L. Waterhouse, M.C. de la Torre-Borrorat, *J. Agric. Food Chem.* 43 (1995) 281–283.
- [13] E.H. Siemann, L.L. Creasy, *Am. J. Enol. Vitic.* 43 (1992) 49–52.
- [14] L. Mark, M.S.P. Nikfardjam, P. Avar, R. Ohmacht, *J. Chromatogr. Sci.* 43 (2005) 445–449.
- [15] T. Galeano-Díaz, I. Duraín-Meraís, D. Airado-Rodríguez, *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 3110–3119.
- [16] I. Kolouchová-Hanzlíková, K. Melzoch, V. Filip, J. Šmidrkal, *Food Chem.* 87 (2004) 151–158.
- [17] J.A.B. Baptista, J.F.D.P. Tavares, R.C.B. Carvalho, *Food Res. Int.* 34 (2001) 345–355.
- [18] A. Antonelli, C. Fabri, G. Lercker, *Chromatographia* 42 (1996) 469–472.
- [19] R. Montes, M. García-López, I. Rodríguez, R. Cela, *Anal. Chim. Acta* 673 (2010) 47–53.
- [20] J.J. Berzas Nevado, A.M. Contento Salcedo, G. Castañeda Peñalvo, *Analyst* 124 (1999) 61–66.
- [21] D. Airado-Rodríguez, T. Galeano-Díaz, I. Durán-Merás, *Food Chem.* 122 (2010) 1320–1326.
- [22] L. Camont, C.H. Cottart, Y. Rhayem, V. Nivet-Antoine, R. Djelidi, F. Collin, J.L. Beaudeau, D. Bonnefont-Rousselot, *Anal. Chim. Acta* 634 (2009) 121–128.
- [23] D. Blache, I. Rustan, P. Durand, G. Lesgards, N. Loreau, *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.* 702 (1997) 103–110.
- [24] D.M. Goldberg, A. Karumanchiri, E. Ng, J. Yan, E.P. Diamandis, G.J. Soleas, *J. Agric. Food Chem.* 43 (1995) 1245–1250.
- [25] J. López-Hernández, P. Paseiro-Losada, A.T. Sanches-Silva, M.A. Lage-Yusty, *Eur. Food Res. Technol.* 225 (2007) 789–796.
- [26] G. Montsko, M.S. Pour Nikfardjam, Z. Szabo, K. Bodd, T. Lorand, R. Ohmacht, L. Mark, *J. Photochem. Photobiol. A* 196 (2008) 44–50.
- [27] I. Durán-Merás, T. Galeano-Díaz, D. Airado-Rodríguez, *Talanta* 74 (2008) 675–682.
- [28] T. Galeano Díaz, I. Durán Merás, D. Airado Rodríguez, *Anal. Bioanal. Chem.* 387 (2007) 1999–2007.
- [29] P. Godoy-Caballero, D. Airado-Rodríguez, I. Durán-Merás, T. Galeano-Díaz, *Talanta* 82 (2010) 1733–1741.
- [30] B.F. Reis, M.F. Gine, E.A.G. Zagatto, J.L.F.C. Lima, R.A. Lapa, *Anal. Chim. Acta* 293 (1994) 129–138.
- [31] R. Pezet, V. Pont, P. Cuenat, *J. Chromatogr. A* 663 (1994) 191–197.
- [32] J.P. Roggero, C. García-Parrilla, *Sci. Aliments* 15 (1995) 411–422.

Indirect determination of aflatoxin B₁ in beer via a multi-commuted optical sensor

Food Additives and Contaminants 29 (2012) 392-402

Indirect determination of aflatoxin B₁ in beer via a multi-commuted optical sensor

Lucía Molina-García, María Luisa Fernández-de Córdoba and Antonio Ruiz-Medina*

Department of Physical and Analytical Chemistry, University of Jaén, Campus Las Lagunillas s/n, 23071 Jaén, Spain

(Received 5 May 2011; final version received 17 November 2011)

This paper reports the determination of aflatoxin B₁ (AFB₁), one of the most carcinogenic substances known. A multi-commuted flow injection–solid phase spectroscopy (FI–SPS) system combined with photochemically induced fluorescence (PIF) was developed, for the first time, for its quantitative determination. A strongly fluorescent degradation product was obtained on-line by irradiation with ultraviolet light. The determination was carried out by measuring the fluorescence intensity of the photo-product at 353/424 ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$), once retained on C₁₈ silica-gel filling the flow-cell. A linear dynamic range of 0.09–12 $\mu\text{g l}^{-1}$, detection limit as sensitive as 29 ng l^{-1} and a relative standard deviation (RSD) of 1.4% were obtained. The method proposed was satisfactorily applied to the determination of AFB₁ in different types of beer (normal and non-alcoholic). Hydrophobic compounds were eliminated from beer samples and AFB₁ was extracted with acetonitrile by solid-phase extraction on C₁₈ sorbent. Recoveries of the target compound from spiked beers were between 94 and 106%. The results obtained in the analysis of real samples are in good agreement with those provided by a reference chromatographic method.

Keywords: screening; sensor; clean-up; mycotoxins; aflatoxins; beer

1. Introduction

Aflatoxins are the main toxic secondary metabolites of the genus *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* (Asis et al. 2002; Ali et al. 2005). Under favourable conditions of temperature and humidity, these fungi grow in food and produce aflatoxins. Mutagenic and carcinogenic activity, teratogenic properties and hepatotoxic action are the most dangerous effects of these compounds on human health (Krska et al. 2008). The occurrence of aflatoxins in food can be caused by both direct contamination via grain and grain products or “carry over” of these compounds and their metabolites into animal tissues, milk and meat after intake of contaminated foodstuffs. The most toxic aflatoxin is aflatoxin B₁ (AFB₁), classified as Group I human carcinogen by the International Agency for Research on Cancer (IARC) (Wang et al. 1998; IARC 2003), resulting in median lethal dose (LD₅₀) values ranging from 0.3 to 9.0 mg kg^{-1} body weight. It is regulated by legislation in foods (EC 2006) for direct human consumption at 2 ng g^{-1} .

The analytical determination of AFB₁ is complicated by two main factors: (1) the complexity of the sample matrix in which it normally appears (corn, peanuts, cottonseed, nuts, almond, figs, fruits and spices) (Gourama and Bulleman 1995; Miller 2008) (AFB₁ can colonize and contaminate grain before harvest or during the storage); and (2) the low levels

present in these samples. Analytical methodologies must be designed to address these requirements. Firstly, to avoid matrix interferences, a typical analysis of AFB₁ involves a liquid liquid extraction (using solvents such as methanol, acetonitrile, and/or their combinations), followed by a clean-up step, e.g. using multifunctional, Florisil or immunoaffinity columns (Nawaz et al. 1995; Giray et al. 2007; Fu et al. 2008; O’Riordan and Wilkinson 2008). Secondly, with respect to its detection, a reliable and sensitive method must be selected for the screening and determination of this compound. Different methods have been established (Turner 2009), including capillary electrophoresis (CE) (Peña et al. 2002), thin-layer chromatography (TLC) (Stroka et al. 2000; Papp et al. 2002; Braicu et al. 2008), high-performance liquid chromatography (HPLC) (Abdulkadar et al. 2000; Gilbert and Vargas 2003; Brera et al. 2007), and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Garden and Strachan 2001; Lee et al. 2004). For positive confirmation, LC MS methods have also been reported (Sforza et al. 2005; Cavaliere et al. 2007). Although sensitive and accurate, most of the chromatographic methods require expensive equipment and derivatisation after extraction to remove interfering substances. Also, commercially available ELISA methods require enzymatic reactions, washing and separation of bound and free label, while CE has

*Corresponding author. Email: anruiz@ujaen.es

remained a research topic rather than finding application in routine analysis (Shepard 2009).

The intrinsic fluorescence of AFB₁, which is due to the presence of a chain of conjugated bonds and heteroatoms in its molecule, could be used for its determination. Nevertheless, the use of spectrofluorimetric analysis is difficult due to the complexity of the matrix, which shows a great variety of natural fluorescent compounds whose spectra often overlap the analyte signal. This situation demands tedious separation steps to enable AFB₁ determination. Different approaches can be used to both avoid these inconveniences and increase the sensitivity of the spectrofluorimetric methods; for example: chemical modification of the molecule with chlorine or bromine (Mably et al. 2005), the use of β -cyclodextrin as fluorescence enhancer (Hashemi et al. 2008) or organised media based on surfactants (Shtykov 2002; Goryacheva et al. 2008), and the possibility of working with photochemically induced fluorescence (PIF).

The current work focuses on the development of a novel method for the detection of AFB₁ in beer. Its incidence in this product has been already described (Scott and Lawrence 1997; Mably et al. 2005; Zollner and Mayer 2006; Romero González et al. 2009; Pietri et al. 2010). This presence is due to its transfer from contaminated grain (barley and maize) during the brewing process. The use of adjuncts during the processing, normally maize grit, explains this contamination; moreover, AFB₁ can be also found in malted barley (Pietri et al. 2010). Sensors may be a good choice for the analysis of AFB₁ due to their fast, simple, and low-cost detection capabilities. Nevertheless, to date only electrochemical sensors (Ammida et al. 2004; Owino et al. 2008; Tan et al. 2009) can be found in literature for the determination of this aflatoxin in alcoholic beverages. No optical sensors have been developed for this purpose.

In this paper, we evaluate the potential of combining PIF with multi-commutation to determine AFB₁ in the complex matrix of beer. The method is based on the on-line generation of a fluorescent photoproduct from AFB₁ by UV-irradiation and its monitoring when adsorbed onto C₁₈ silica gel. The measurement of the photoproduct retained on this solid support, packed in the flow-cell placed in the detection area, was adopted for improving both detection limit and selectivity. The enhancement in selectivity makes it possible to analyse complex samples, such as beer, whose analysis would not be possible in homogeneous solution due to the high number of interfering species. This methodology, called flow injection solid phase spectroscopy (FI-SPS) or flow-through optosensor, combines the advantages of FI with analyte pre-concentration on a small amount of a solid support (López Flores et al. 2005). The use of multi-commutation, as an alternative to conventional FIA,

is introduced due to its favourable intrinsic advantages such as low-cost equipment, high sample throughput and simplicity, as long as automation is complete (Reis et al. 1994; Catalá-Icardo et al. 2002). To the authors' knowledge, this is the first PIF determination of AFB₁ in beer to be reported. This is also the first application of multi-commuted-flow methodology to the determination of this aflatoxin. Spiked as well as real samples of beer were used to validate the results.

2. Materials and methods

2.1. Apparatus and instrumentation

A Varian Cary-Eclipse Luminescence spectrometer (Varian Inc., Mulgrave, Australia) was used for recording spectra and making fluorescence measurements. It was controlled by a microprocessor fitted with a Cary-Eclipse (Varian) software package for data collection and treatment. The following instrumental parameters were used: excitation and emission slit widths were set at 10 and 20 nm, respectively, and photomultiplier voltage was 630 V. The excitation and emission wavelengths established were 353/424 nm for the fluorescent photoproduct.

The multi-commuted flow system is shown in Figure 1. It was built with a four-channel Gilson Minipuls-3 (Villiers Le Bell, France) peristaltic pump fitted with a rate selector and Solvflex type pump tubing (Elkay Products, Shrewsbury, MA, USA), three 161T031 NResearch three-way solenoid valves (Neptune Research, Northboro, MA, USA) and an electronic interface based on ULN 2803 integrate circuits. The valves were operated at an electric potential of 12 V and a direct current of 100 mA. PTFE tubing (0.8 mm I.D.) and methacrylate connections were also used. The software for controlling the system was developed in Visual Basic 6.0 by our research group. A 176.752-QS Hellma flow cell (Müllheim, Baden, Germany) (inner volume, 25 μ l; light path length, 1.5 mm) filled with C₁₈ silica gel was used in the detection area. The solid support was loaded as methanol slurry just up to a height which enabled the light beam to pass completely through the solid phase and the outlet was locked with glass wool, to avoid the beads movement and allow the continuous flow.

For the photochemical on-line AFB₁ conversion, a laboratory-made photoreactor was prepared by loosely coiling 400 cm of PTFE tubing around a low-pressure mercury lamp (15 W, 254 nm). The UV lamp was wrapped in aluminium paper and it was introduced into an aluminium box for maximum light reflection and heat dissipation. The photoreactor was placed just between V₃ and the detection area (see Figure 1). All the experiments were carried out at room temperature.

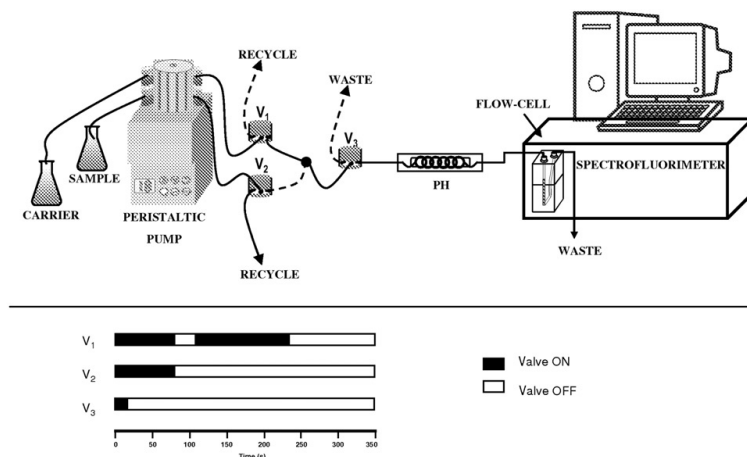


Figure 1. Multi-commuted flow-injection system. Carrier solution (25% v/v, methanol/water solution). V_1 , V_2 and V_3 : three-way solenoid valves; PH: photo-reactor. Flow cell filled with C_{18} silica gel. For each solenoid valve, the solid and dotted lines refer to "Off" and "On" positions, respectively. Flow-rate: 2 ml min^{-1} . The lower scheme shows the valve time program (sampling time: 60 s).

Other apparatus consisted of a vacuum system 12-port Visiprep SPE Vacuum Manifold (Supelco, Bellefonte, PA, USA), a Crison Model 2002 pH-meter with a glass/saturated calomel combination electrode (Crison, Barcelona, Spain) and a Selecta Ultrasons ultrasonic bath (Barcelona, Spain).

2.2. Reagents and solutions

AFB_1 from *Aspergillus flavus* was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). The stock standard solution (50 mg l^{-1}) was prepared by dissolving 5 mg of the analyte in a 50% (v/v) methanol/water solution. It was kept away from light with aluminium foil and stored at 4°C in a refrigerator, remaining stable for at least 4 weeks. Working standard solutions were prepared daily by taking an aliquot of the stock solution and diluting with ultrapure water obtained from a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA). All reagents were analytical reagent grade. The carrier solution (25% (v/v) methanol/water solution) was prepared by dissolving the required volume of methanol in water. C_{18} bonded phase silica gel beads ($55 \text{ } 105 \mu\text{m}$ average particle size) (Waters, Milford, MA, USA) was used as active solid support in the detection area. Cation and anion exchangers (Sephadex SP C-25, Sephadex CM C-25, Sephadex QAE A-25 and Sephadex DEAE A-25, all of them having $40 \text{ } 120 \mu\text{m}$ average particle size) (Sigma, Alcobendas, Madrid, Spain) were also tested for the retention of AFB_1 photoproduct.

Methanol, acetonitrile, toluene and cyclohexane were obtained from Panreac (Barcelona, Spain).

Octadecyl (C_{18}) Bakerbond SPE cartridges of 6 ml with 500 mg of packing material (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA) and $0.20\text{-}\mu\text{m}$ nylon filters (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) were also used for solid phase extraction (SPE) procedure.

2.3. Sample preparation

Seventeen different Spanish beers were purchased from local markets. The sample was kept away from the daylight, as far as possible, with the aid of aluminium foil, throughout the process.

2.3.1. Pre-cleaning of the sample

A previous hydrophobic compounds removal, with toluene and cyclohexane, was carried out to improve the subsequent extraction. Initially, beers were previously degassed by sonication and then aliquots of 1 ml were spiked with known amounts of AFB_1 . Next, they were treated under gentle stirring, in consecutive 3-min steps, first with 1 ml of toluene (twice) and then with 1 ml of cyclohexane (twice). At the end of each step, the mixture was centrifuged for 5 min at 3500 rpm, and the supernatant was discarded. Finally, cleaned beer was dried under a gentle stream of nitrogen to get rid of residual solvent.

2.3.2. Extraction of AFB_1

A C_{18} cartridge was conditioned by passing consecutively 10 ml of acetonitrile and 10 ml of water. Subsequently, cleaned beer was loaded onto the

column at a flow-rate of 2.3 ml min^{-1} under vacuum. Then, the cartridge was washed with 10 ml of water and vacuum dried for 1 min. Finally, AFB₁ retained in the cartridge was eluted with $2 \times 1 \text{ ml}$ of acetonitrile and the eluate was concentrated to dryness under a gentle stream of nitrogen. The residue was re-dissolved to a final volume of 10 ml in a 5% (v/v) methanol/water solution and the pH value was adjusted at 5.5 by adding an HNO₃ or NaOH solution.

2.4. Procedure

The schematic valve system diagram is shown in Figure 1. All experiments were carried out in triplicate, and the results are expressed as peak height mean values. In the initial status, the UV lamp and the peristaltic pump were switched on to condition the flow system (constant flow rate 2 ml min^{-1}) until a stable baseline was recorded. With all valves switched off, the carrier solution (25% (v/v) methanol/water solution) flowed through the system, while the sample solution was recycled to its vessel. Then, to insert the sample in the flow system, valves V₁ and V₂ were switched on for 75 s and V₃ for 15 s. In this way, the sample solution circulated through the system, whereas the carrier solution was recycled to its recipient. For the first 15 s of this step, the sample plug was directed towards the waste through V₃, so cleaning the tubing between V₁ and V₃ with the new sample solution. Over the next 60 s, as V₃ was deactivated, the sample plug was pumped towards the photo-reactor. After this, all valves were switched off again for 35 s, the time required for the sample solution to stay into the photo-reactor. At this point, valve V₁ was switched on for 120 s, to recycle the carrier solution to its recipient and stop the flow, so allowing the photo-degradation process. Finally, when valve V₁ was switched off and the photo-degradation product arrived to the flow-cell, the analytical signal was measured at the corresponding wavelengths, 353/424 nm/nm. The lamp was always switched on during a whole experimental session to obtain the best precision.

3. Results and discussion

3.1. Optimisation of AFB₁ extraction

The fluorescence photo-degradation product generated from AFB₁ is selectively adsorbed on the non-ionic exchanger C₁₈ silica gel under working conditions. Nevertheless, owing to the fact that some mycotoxins found in cereals, such as ochratoxin A, aflatoxins, fumonisins, and trichothecenes (deoxynivalenol, T-2, and HT-2 toxins), can survive the brewing process, they can also be detected in beer (Romero González et al. 2009). A previous clean-up step was necessary to ensure the elimination of others species, including these

common mycotoxins present in beers, which could be retained on the solid-phase in the detection area and compete with the photo-degradation product for the active sites.

Most often used as a clean-up step and direct extraction of liquid samples, in mycotoxins analysis, is SPE. With the purpose of establishing a reliable SPE method for the extraction of AFB₁ from several types of beer, some recommendations were taken into account according to the literature (Kralj Cigic and Prosen 2009). First, C₁₈ cartridges were selected for the extraction procedure due to the slightly better affinity for aflatoxins, compared with others mycotoxins. Second, to elute the target compound, acetonitrile was used because it has demonstrated a higher selectivity for aflatoxins (B₁, B₂, G₁, and G₂) and HT-2 and T-2 toxins, whilst fumonisins (B₁ and B₂) were not extracted when this solvent was applied. In addition, these two latter mycotoxins were eliminated in the washing step, before elution, due to their high solubility in water. The washing and elution volumes were optimised taking into account both the elimination of the most polar interfering substances without eluting AFB₁ and the most complete extraction of this latter. The volumes selected were 10 ml of water and 2 ml of acetonitrile.

Due to a large decrease in the fluorescence of AFB₁ and its photoproduct when they were diluted in acetonitrile, it was necessary to evaporate the extract and solubilise it in methanol. The percentage of methanol necessary for the solubilisation of the final residue, once the target compound extracted of the C₁₈ cartridge and evaporated, was tested in the range 0–30% (v/v) methanol/water solution. For dilutions with methanol in a percentage larger than 10%, the fluorescence signal decreased. Therefore, the minimum amount of methanol capable of dissolving AFB₁ which was 5% (v/v) methanol/water solution, was selected as optimum.

A pre-cleaning step, prior to the SPE procedure, was also necessary to remove hard and soft resins (Molina García et al. 2011). It was fulfilled in the way described in Section 2.3. If it is not carried out, AFB₁ is poorly recovered, probably due to the competition between the target compound and those high molecular weight substances for active sites on the C₁₈ cartridge.

3.2. Preliminary test of sorption

The native fluorescence of AFB₁ can be enhanced by photochemical derivatisation procedures. This technique allows a significant increase in the fluorescence signal of AFB₁ due to the reaction with hydroxyl radical produced from water by ultraviolet radiation, which leads to new structures with stable and higher

fluorescence (Joshua 1993). This is an interesting alternative to its chemical derivatisation in simplifying the system, reducing the consumption of reagents and enhancing selectivity. With the purpose of improving, even more, both the sensitivity and selectivity of the determination of AFB₁ after its photo-chemical conversion with UV irradiation, several sorption tests of both the original compound and the fluorescent photoproduct on different solid supports were carried out. The retention assays were performed at different pH values and with anion-exchangers (Sephadex QAE A-25, and Sephadex DEAE-25), cation-exchangers (Sephadex SP C-25 and Chelex 100) and non-ionic supports (C₁₈ silica gel). In all cases, a high signal was obtained when a solid support was used, being practically insignificant in the case of cationic exchangers. However, the others (anionic and non-ionic exchangers) provided a significant retention. Anion-exchangers allowed a very strong retention of the AFB₁ photoproduct, but its complete elution was very difficult in a reasonable time. Finally, C₁₈ silica gel was selected since it provided both a strong retention and a quick elution of the AFB₁ photoproduct.

Fluorescence spectra of AFB₁ and its photo-degradation product, recorded in homogeneous solution, showed maximum excitation/emission wavelengths at 359/446 and 359/435 nm, respectively (Figure 2). This is in agreement with the theoretical blue fluorescence under UV light (430–530 nm for excitation) belonging to AFB₁ and AFB₂, as opposed to AFG₁ and AFG₂, which have green fluorescence (530–590 nm). The spectra of the AFB₁ photo-degradation product retained on C₁₈ resin showed maxima excitation/emission wavelengths at 353/424 nm (Figure 2). As a result of the pre-concentration

process of the AFB₁ photo-degradation product on the active sensing area, a 20-fold increase in the PIF signal was obtained when SPS methodology was used.

AFB₂ aflatoxin (AFB₂) is an important interfering species in the fluorimetric determination of AFB₁ due to the substantial overlapping of their spectra (Mohammad et al. 2007). The tolerated AFB₂/AFB₁ (w/w) ratio in homogeneous solution is about 0.1, which makes impossible to determine AFB₁ in the presence of AFB₂ without a previous separation of the latter. As we ascertained, in the established working conditions, AFB₂ did not photo-degrade under UV irradiation, which agrees with the results previously found by other authors in aflatoxin photo-degradation tests (Joshua 1993). On the other hand, although AFB₂ itself was retained on the C₁₈ silica gel solid support, it did not interfere in the AFB₁ determination at the concentration levels usually found in beer. This fact can be attributed to the increase in the AFB₁ fluorescence signal provided by both its photo-degradation and the sorption of the photoproduct generated on a solid support and to the improvement in selectivity originated by the measurement of the analytical signal in solid phase.

Taking into account the possible retention of other organic compounds of the matrix on C₁₈ silica gel, the emission and excitation slits and filters were selected to provide the best sensitivity and selectivity, respectively. The selected excitation and emission slits were 10 and 20 nm, respectively. Filter ranges were set at 250–395 nm for excitation and 420–1100 nm for emission. These values also supplied the best ratio between analytical signal and background noise. Using the same criterion, the voltage of the photomultiplier tube was set at 630 V.

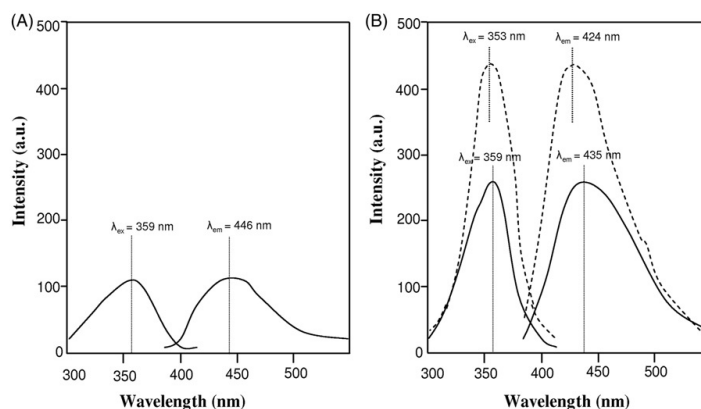


Figure 2. Excitation and emission fluorescence spectra of: (A) AFB₁ in homogeneous solution (0.2 mg l⁻¹) and (B) photoproduct of AFB₁ in homogeneous solution (continuous line) and retained on C₁₈ silica gel (dashed line). Notes: 0.1 mg l⁻¹ of AFB₁ (in solution); 12 μg l⁻¹ of AFB₁ (in solid phase); pH 5.5; irradiation time 120 s.

3.3. Chemical variables

Photo-chemical conversion of AFB₁, as well as the fluorescence properties of the obtained photoproduct and its sorption on the solid support is governed by the pH value. Therefore, this is one of the most important variables to be taken into account. The influence of this variable was studied by inserting into the system different analyte solutions adjusted, using HNO₃ or NaOH, to pH values ranging from 1 to 11. The maximum fluorescence signal was obtained when pH 5.5 was used (Figure 3). Higher or lower pH values caused a decrease in the intensity of fluorescence. Therefore, a pH value of 5.5 was selected as optimum for subsequent experiments. Several buffer solutions in a pH ranging 5.0–6.0 and concentration levels between 0.01 and 0.1 mol l⁻¹ were tested (citric acid/sodium hydroxide; sodium acetate/acetic acid; tartaric acid/sodium hydroxide). The same variation was observed in all cases; fluorescence intensity decreased by half when comparing to the absence of buffer solution. This performance may be due to the interference of buffer ions in the photochemical conversion of AFB₁, so a sample solution without buffering was finally chosen.

The nature of the carrier solution mainly affects the sorption of the photo-degradation product on the solid support. Taking into account the non-polar nature of the solid support used in this case, aqueous solutions with different methanol percentage, up to 45% (v/v), were tested to obtain the maximum retention of the AFB₁ photoproduct. A solution of 20% (v/v) methanol provided the highest analytical signal and a decrease in this latter was observed for higher and lower methanol percentages. On the other hand, an incomplete elution of the photoproduct was achieved for methanol percentages lower than 25%. Therefore, as a compromise between sensitivity and complete regeneration of the solid support, a solution of 25% (v/v) methanol/water was selected as carrier solution.

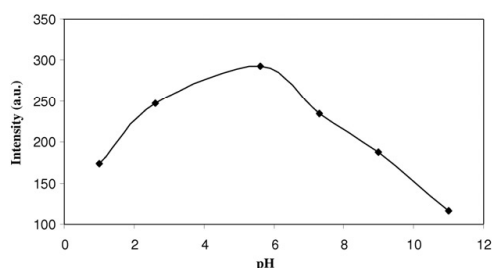


Figure 3. Influence of pH of the sample solution. Notes: 8 $\mu\text{g l}^{-1}$ AFB₁; carrier solution 25% MeOH (v/v); sampling time 60 s; irradiation time 120 s.

3.4. Flow system variables

3.4.1. Irradiation time

The irradiation time is the residence time of the sample inside the photo-reactor under UV radiation. It is another critical variable in PIF methodology. To optimize this variable, 2 ml of 8 $\mu\text{g l}^{-1}$ AFB₁ solution were inserted in the system (2 ml min⁻¹), the flow was stopped just when the whole plug of sample was within the photo-reactor (400 cm) and this was irradiated for increasing periods of time. After turning off the lamp and re-establishing the flow, the fluorescence signal was recorded. The results showed that the kinetic of photo-degradation of AFB₁ under working conditions is slow (Figure 4). The maximum fluorescence signal was obtained with an irradiation time of 120 s. Therefore, this value was selected as optimal.

3.4.2. Flow rate and photo-reactor length

In general, the residence time of the sample in the photochemical reactor and, consequently, the irradiation time can be controlled by the flow-rate and/or the length of the tubing around the lamp. As the time required for AFB₁ degradation is high, instead of using long photo-reactor tubing or stopping the peristaltic pump, the carrier solution was recycled for the required time (120 s) once the sample plug was placed inside the photo-reactor, so stopping the circulation of the sample solution through the system. Consequently, the length of the photo-reactor was selected as the minimum required to accommodate the whole sample plug (2 ml), namely 400 cm.

Thus, 2 ml min⁻¹ was the flow-rate established. This was the maximum flow-rate allowed by the flow-system without causing over-pressure problems and it also allowed the best throughput of the method.

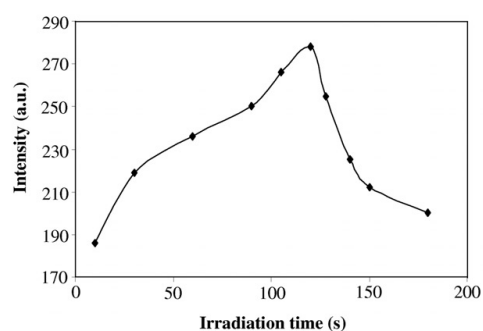


Figure 4. Influence of irradiation time on the fluorescence signal of AFB₁. Notes: 8 $\mu\text{g l}^{-1}$ of AFB₁; sampling time 60 s; flow-rate 2 ml min⁻¹; photo-reactor length 400 cm.

3.4.3. Sampling time

In flow-through sensors, is possible to improve sensitivity by only increasing the sample volume inserted in the system. This is a consequence of the sorption of increasing amounts of analyte in the detection area on a constant amount of solid support. This feature allows both the enhancement of sensitivity, by increasing the sample volume, and the reduction of strong matrix effects by means of a previous dilution of the sample before its insertion in the system.

In a multi-commuted system, the sample volume can be controlled by varying the sampling time. With a $8 \mu\text{g l}^{-1}$ solution of AFB₁ and sampling times ranging from 10 to 80 s, the fluorescence signal increased linearly until a value of 60 s. In addition, the throughput of the system was also affected by this variable. Figure 5 shows the influence of sampling time. Sampling times lower than 60 s provided a quicker elution of the photoproduct from the solid support but they also caused a significant decrease in the analytical signal. Therefore, a 60-s sampling time was selected as a compromise between fluorescence intensity and peak time. Higher sampling times produced higher analytical signals than that obtained with 60 s. However, they also caused wider flow peaks, so decreasing the sampling frequency.

3.5. Figures of merit

Under the above established optimum working conditions, a calibration curve was constructed for the photoproduct of AFB₁ after injecting, in triplicate, sample solutions containing increasing concentrations

of the analyte. Analytical figures of merit are given in Table 1. Quantification was carried out by using peak height as analytical signal. Data were fitted by standard least-squares treatment. The proposed methodology responds linearly in the AFB₁ concentration range $0.09\text{--}12 \mu\text{g l}^{-1}$. The standard deviations of the intercept and slope were also calculated (average of three determinations). Detection limit (LOD) and quantification limit (LOQ) were estimated as the concentration that produced a fluorescence signal equal to 3 and 10 times the standard deviation of background fluorescence, respectively (MacDougall 1980). The LOD obtained with the proposed method allows the determination of this aflatoxin in beer at trace levels. This value, $0.029 \mu\text{g l}^{-1}$, is similar to or lower than, in most cases, previously reported values (Table 2). On the other hand, the LOQ is much lower

Table 1. Analytical parameters.

Parameter	Value
Linear dynamic range ($\mu\text{g l}^{-1}$)	0.09–12
Calibration graph	
Intercept	6.68 ± 0.04
Slope ($1 \mu\text{g}^{-1}$)	34.8 ± 0.07
Correlation coefficient	0.9994
Detection limit ($\mu\text{g l}^{-1}$)	0.029
Quantification limit ($\mu\text{g l}^{-1}$)	0.09
Intraday RSD (%) ^a	1.4 ^b
Interday RSD (%) ^a	2.9 ^b
Sampling frequency (h^{-1})	10

Note: ^a $n = 10$; ^b[AFB₁] = $5 \mu\text{g l}^{-1}$.

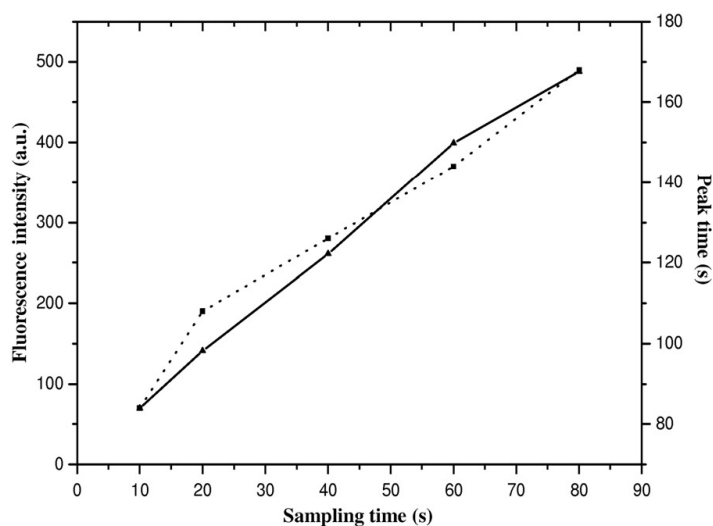


Figure 5. Influence of sampling time on fluorescence intensity (continuous line) and peak time (dashed lines). Notes: $8 \mu\text{g l}^{-1}$ AFB₁; pH 5.5; irradiation time 120 s; flow-rate 2 ml min^{-1} .

Table 2. Comparison of the proposed method with others reported in the literature.

Method	Linear range	LOD	Sample	Ref.
Liquid Chromatography (UHPLC) (mass spectrometry)	0.5–100 ($\mu\text{g l}^{-1}$)	0.04 ($\mu\text{g l}^{-1}$)	Beers	Romero González et al. (2009)
Liquid Chromatography (UPLC) (mass spectrometry)	1–15 ($\mu\text{g l}^{-1}$)	0.1 ($\mu\text{g l}^{-1}$)	Beers	Ventura et al. (2006)
Liquid Chromatography (fluorescence detection)	–	0.019 ($\mu\text{g l}^{-1}$)	Beers	Scott and Lawrence (1997)
Liquid Chromatography (HPLC) (fluorescence detection)	5–35 ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	0.06 ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Animal feeds	Wejdan et al. (2010)
Liquid Chromatography (HPLC) (fluorescence detection)	0.05–24 ($\mu\text{g l}^{-1}$)	0.015 ($\mu\text{g l}^{-1}$)	Food samples	Herzallah Saqer (2009)
Liquid Chromatography (HPLC) (fluorescence detection)	0.5–4 ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	0.02 ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Breakfast cereals	Polixeni and Panagiota (2009)
Liquid Chromatography (UV detection)	20–200 ($\mu\text{g l}^{-1}$)	0.32 ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Corn and peanuts	Fu et al. (2008)
Liquid Chromatography (HPLC–PD–FD)	0.1–20 ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	0.035 ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Cereal flours	Quinto et al. (2009)
Liquid Chromatography (HPLC–PCD–FD)	–	0.1 ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Rice	Mansoorreh (2009)
Spectrofluorimetry	0–18 ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	0.9 ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Wheat	Hashemi et al. (2008)
Spectrofluorimetry	0–15 ($\mu\text{g l}^{-1}$)	–	Pistachio	Mohammad et al. (2007)
Liquid Chromatography (reversed-phase with fluorescence detection)	–	46 ($\mu\text{g l}^{-1}$)	Beers	Mably et al. (2005)
Electrochemical immunosensor	0.1–10 ($\mu\text{g l}^{-1}$)	0.06 ($\mu\text{g l}^{-1}$)	Rice	Tan et al. (2009)
Voltammetry	0.4–40 ($\mu\text{g l}^{-1}$)	0.15 ($\mu\text{g l}^{-1}$)	Groundnut	Hajian and Ensafi (2009)

Table 3. Determination of AFB₁ in beers.

Sample	Proposed method		Reference method	$t_{\text{calc}}^{\text{b}}$	$F_{\text{calc}}^{\text{c}}$
	Added ($\mu\text{g l}^{-1}$)	Found $\pm \sigma^{\text{a}}$ ($\mu\text{g l}^{-1}$)	Found $\pm \sigma^{\text{a}}$ ($\mu\text{g l}^{-1}$)		
Beer 1 (Normal)	–	0.86 \pm 0.05	0.90 \pm 0.02	1.28	6.25
	1	1.90 \pm 0.09	1.95 \pm 0.05	0.87	3.24
	2	2.83 \pm 0.03	2.86 \pm 0.10	1.66	0.10
	4	4.84 \pm 0.04	4.96 \pm 0.04	2.12	0.21
Beer 2 (Normal)	–	0.28 \pm 0.03	0.29 \pm 0.08	0.20	0.14
	2	2.33 \pm 0.05	2.25 \pm 0.06	1.77	0.70
	4	4.24 \pm 0.09	4.30 \pm 0.02	1.22	20.25
	6	6.30 \pm 0.06	6.36 \pm 0.08	1.04	0.56
Beer 3 (Normal)	–	0.17 \pm 0.07	0.15 \pm 0.06	0.37	1.36
	6	6.22 \pm 0.05	6.19 \pm 0.02	0.96	6.25
	8	8.28 \pm 0.08	8.17 \pm 0.09	1.15	0.79
	10	9.95 \pm 0.02	10.13 \pm 0.03	2.16	1.96
Beer 4 (Normal)	–	<LOD	<LOD	–	–
	1	0.94 \pm 0.07	1.06 \pm 0.04	2.56	3.06
	3	3.08 \pm 0.04	2.97 \pm 0.01	2.68	0.44
	5	5.11 \pm 0.08	5.20 \pm 0.06	1.56	1.77
Beer 5 (Non-alcoholic)	–	<LOD	<LOD	–	–
	7	6.84 \pm 0.05	6.95 \pm 0.03	1.54	2.77
	9	9.19 \pm 0.02	8.88 \pm 0.01	2.72	0.44
	11	11.74 \pm 0.08	11.46 \pm 0.08	2.25	0.98

Notes: ^aAverage of three replicates.^bTheoretical value 2.772 ($p = 0.05$).^cTheoretical value 39.00 ($p = 0.05$).

than the maximum level fixed by European Commission (EC 2006) regulation for all cereals and products derived from cereals ($2 \mu\text{g kg}^{-1}$), so making the method suitable for routine analysis.

Intra-day repeatability was established by comparing the response of 10 independent determinations for solutions containing $5 \mu\text{g l}^{-1}$ of AFB₁. Inter-day repeatability was also performed over 10 consecutive days. The RSDs obtained, in both cases, were low, even though the measurements are made in the solid phase.

3.6. Analytical applications

The proposed flow-through optosensor was successfully applied to the determination of AFB₁ in beer. The pre-treatment and procedure described in Section 2 were used in each instance. The slope of the calibration curve obtained by spiking the final beer extracts with AFB₁ differed to that obtained by spiking the original samples, and both differed to that obtained by external calibration. This demonstrated the existence of a light (slight) negative matrix effect, due to the presence in the final extracts of interfering species and the incomplete recovery of AFB₁ after pre-treatment. Consequently, the calibration curves were constructed with matrix-matched standards, i.e. the analysis was carried out by spiking different aliquots of a beer sample with increasing amounts of the analyte. The matrix effect was evaluated by comparing the slopes of aqueous standards and standard addition calibration curves for different beer samples ($m_{\text{standard}}/m_{\text{standard-addition}} \approx 0.9$). Of the 17 beers analysed, including normal ($n=12$) and non-alcoholic ($n=5$) beers, only three samples contained traces of the target compound (0.86, 0.28 and $0.17 \mu\text{g l}^{-1}$). AFB₁ was not detected in the remaining beer samples investigated, including non-alcoholic beers.

A recovery study, at three concentration levels, was also performed on the three samples with and the two samples without AFB₁. The results are summarized in Table 3. In all cases good recoveries, ranging from 94 to 106%, were achieved. The applicability of the proposed method to the analysis of AFB₁ in beer was demonstrated by comparison with a reference method (Romero González et al. 2009), based on ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. A statistical analysis of precision and accuracy for both the proposed and reference method was performed using the *F* criterion and *t*-test, respectively (Saunders and Fleming 1971). The results in every case (Table 3) show that there is no significant statistical difference between the methods, indicating the utility of the proposed method for routine analytical control.

4. Conclusions

A new automatic spectroscopic method for the analysis of AFB₁ in beer has been developed. A photochemical-induced fluorescence-based flow-through sensor, making use of the multi-commuted assembly, has been applied. The fluorescent photoproduct generated on-line was selectively retained on an active solid support, causing a transitory fluorescent signal. This fact, combined with the clean-up step and SPE extraction of the beer samples, makes the presented method highly sensitive and selective, with low reagent consumption, ease of handling, increased rapidity and simplicity, and low cost. Although the determination of AFB₁ in complex matrices by the proposed method needs a previous pre-treatment, the time taken is compensated for by the speed in measurement of the analytical signal.

The detection limits of the proposed method are similar or even lower than those obtained using reported chromatographic methods for AFB₁ determination in beer and other matrices. Therefore, it can be considered as an interesting alternative to the chromatographic determination of this aflatoxin. In addition, the results obtained in the analysis of several types of beer compare well against those supplied by a reference liquid chromatography method. All this shows the feasibility of the proposed optosensor as a screening method for the determination of AFB₁ in non-alcoholic and normal beers.

Acknowledgements

The authors acknowledge the financial support from "Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa" (Junta de Andalucía), Project P07-FQM-02673. LMG also acknowledges a research fellowship from the Spanish MEC.

References

- Abdulkadar AHW, Al-Ali A, Al-Jedah J. 2000. Aflatoxin contamination in edible nuts imported in Qatar. *Food Control*. 11:157–160.
- Ali N, Hasmin NH, Saad B, Safan K, Nakajima M, Yoshizawa T. 2005. Evaluation of a method to determine the natural occurrence of aflatoxins in commercial traditional herbal medicines from Malaysia and Indonesia. *Food Chem Toxicol*. 43:1762–1772.
- Ammida NHS, Micheli L, Palleschi G. 2004. Electrochemical immunosensor for determination of aflatoxin B1 in barley. *Anal Chim Acta*. 520:159–164.
- Asis R, Romina D, Paola DI, Mario AJ. 2002. Determination of aflatoxin B1 in highly contaminated peanut samples using HPLC and ELISA. *Food Agric Immunol*. 14:201–208.
- Braicu C, Puia C, Bodoki E, Socaciu C. 2008. Screening and quantification of aflatoxins and ochratoxin A in different

- cereals cultivated in Romania using thinlayer chromatography–densitometry. *J Food Qual.* 31:108–120.
- Brera C, Debegnach F, Minardi V, Pannunzi E, De Santis B, Miraglia M. 2007. Immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography for determination of aflatoxin B1 in corn samples: interlaboratory study. *J AOAC Int.* 90:765–772.
- Catalá-Icardo M, García-Mateo JV, Martínez-Calatayud J. 2002. Multicommutation as a powerful new analytical tool. *Trends Anal Chem.* 21:366–378.
- Cavaliere C, Foglia P, Guarino C, Nazzari M, Samperi R, Lagana A. 2007. Determination of aflatoxins in olive oil by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta.* 596:141–148.
- EC. 2006. European Commission Regulation No. 1831/2006 of 19 December 2006. *Off J Eur Union L364/5.*
- Fu Z, Huang X, Min S. 2008. Rapid determination of aflatoxins in corn and peanuts. *J Chromatogr A.* 1209:271–274.
- Garden SR, Strachan NJC. 2001. Novel colorimetric immunoassay for the detection of aflatoxin B1. *Anal Chim Acta.* 444:187–191.
- Gilbert J, Vargas EA. 2003. Advances in sampling and analysis for aflatoxins. *J Toxicol.* 22:381–422.
- Gray B, Girgin G, Egin AB, Aydin S, Sahin G. 2007. Aflatoxin levels in wheat samples consumed in some regions of Turkey. *Food Control.* 18:23–29.
- Goryacheva IY, Rusanova TY, Pankin KE. 2008. Fluorescent properties of aflatoxins in organized media based on surfactants, cyclodextrins, and clixresorcinar-anes. *J Anal Chem.* 63:751–755.
- Gourama H, Bulleman LB. 1995. Relationship between aflatoxin production and mold growth as measured by ergosterol and plate count. *J Food Prot.* 58:1395–1404.
- Hajian R, Ensafi AA. 2009. Determination of aflatoxins B1 and B2 by adsorptive cathodic stripping voltammetry in groundnut. *Food Chem.* 115:1034–1037.
- Hashemi J, Kram GA, Alizadeh N. 2008. Enhanced spectrofluorimetric determination of aflatoxin B1 in wheat by second-order standard addition method. *Talanta.* 75:1075–1081.
- Herzallah Saqer M. 2009. Determination of aflatoxins in eggs, milk, meat and meat products using HPLC fluorescent and UV detectors. *Food Chem.* 114:1141–1146.
- International Agency for Research on Cancer (IARC). 1993. Monographs 6 on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Lyon: IARC, p. 245–395.
- Joshua H. 1993. Determination of aflatoxins by reversed-phase high performance liquid chromatography with post-column in-line photochemical derivatisation and fluorescence detection. *J Chromatogr A.* 654:247–254.
- Kralj Cigic I, Prosen H. 2009. An overview of conventional and emerging analytical methods for the determination of mycotoxins. *Int J Mol Sci.* 10:62–115.
- Krska R, Schubert UP, Molinelli A, Sulyok M, MacDonald S, Crews C. 2008. Mycotoxin analysis: an update. *Food Addit Contam.* 25:152–163.
- Lee NA, Wang S, Allan RD, Kennedy IR. 2004. A rapid aflatoxin B1 ELISA: development and validation with reduced matrix effects for peanuts, corn, pistachio, and soybeans. *J Agric Food Chem.* 52:2746–2755.
- López-Flores J, Fernández-De Córdova ML, Molina-Díaz A. 2005. Implementation of flow-through solid phase spectroscopic transduction with photochemically induced fluorescence: Determination of thiamine. *Anal Chim Acta.* 535:161–168.
- Mably M, Mankotia M, Cavlovic P, Tam J, Wong L, Pantazopoulos P, Calway P, Scott PM. 2005. Survey of aflatoxins in beer sold in Canada. *Food Addit Contam.* 22:1252–1257.
- MacDougall D. 1980. Guidelines for data acquisition and data quality evaluation in environmental chemistry. *Anal Chem.* 52:2242–2249.
- Mansoor M. 2009. Determination of aflatoxins in imported rice to Iran. *Food Chem Toxicol.* 47:2064–2066.
- Miller JD. 2008. Mycotoxins in small grains and maize: old problems, new challenges. *Food Addit Contam.* 25:219–230.
- Mohammad A, Javad H, Gholamreza AK, Naader A. 2007. Enhanced synchronous spectrofluorimetric determination of aflatoxin B1 in pistachio samples using multivariate analysis. *Anal Chim Acta.* 582:288–294.
- Molina García L, Ruiz Medina A, Fernández-de Córdova ML. 2011. A novel multicommuted fluorimetric optosensor for determination of resveratrol in beer. *Talanta.* 83:850–856.
- Nawaz S, Coker RD, Haswell SJ. 1995. HPTLC—a valuable chromatographic tool for the analysis of aflatoxins. *J Planar Chromatogr.* 8:4–9.
- Papp E, Otta KH, Zaray G, Mincovics E. 2002. Liquid chromatographic determination of aflatoxins. *Microchem J.* 73:39–46.
- Peña R, Alcaraz MC, Arce L, Rios A, Valcarcel M. 2002. Screening of aflatoxins in feed samples using a flow system coupled to capillary electrophoresis. *J Chromatogr A.* 967:303–314.
- Pietri A, Bertuzzi T, Agosti B, Donadini G. 2010. Transfer of aflatoxin B1 and fumonisin B1 from naturally contaminated raw materials to beer during an industrial brewing process. *Food Addit Contam.* 27:1431–1439.
- Polixeni V, Panagiota M. 2009. Aflatoxin B1 and ochratoxin A in breakfast cereals from Athens market: occurrence and risk assessment. *Food Control.* 20:455–461.
- O’Riordan MJ, Wilkinson MG. 2008. A survey of the incidence and level of aflatoxin contamination in a range of imported spice preparations on the Irish retail market. *Food Chem.* 107:1429–1435.
- Owino JHO, Arotiba OA, Hendricks N, Songa EA, Jahed N, Waryo TT, Ngece RF, Baker PGL, Iwuoha EI. 2008. Electrochemical immunosensor based on polythionine/gold nanoparticles for the determination of aflatoxin B1. *Sensors.* 8:8262–8274.
- Quinto M, Spadaccino G, Palermo C, Centonze D. 2009. Determination of aflatoxins in cereal flours by solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography and post-column photochemical derivatisation–fluorescence detection. *J Chromatogr A.* 1216:8636–8641.
- Reis BF, Gine MF, Zagatto EAG, Lima JLFC, Lapa RA. 1994. Multicommutation in flow analysis. Part 1. *Anal Chim Acta.* 293:129–138.
- Romero González R, Martínez Vidal JL, Aguilera Luiz MM, Garrido Frenich A. 2009. Application of conventional solid-phase extraction for multimycotoxin analysis in beers

402 L. Molina-García et al.

- by ultrahigh-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem.* 57:9385–9392.
- Saunders L, Fleming R. 1971. *Mathematics and statistics*. 2nd ed. London: Pharmaceutical Press, p. 192.
- Scott PM, Lawrence GA. 1997. Determination of aflatoxins in beer. *J AOAC Int.* 80:1229–1234.
- Sforza S, Dall'Asta C, Marchelli R. 2005. Recent advances in mycotoxin determination in food and feed by hyphenated chromatographic techniques/mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev.* 25:54–76.
- Shepard GS. 2009. Aflatoxin analysis at the beginning of the 21st century. *Anal Bioanal Chem.* 395:1215–1224.
- Shtykov SN. 2002. Chemical analysis in nanoreactor: main concepts and applications. *J Anal Chem.* 57:859–868.
- Stroka J, Otterdijk RV, Anklam E. 2000. Immunoaffinity column clean-up prior to thin-layer chromatography for the determination of aflatoxins in various food matrices. *J Chromatogr A.* 904:251–256.
- Tan Y, Chu X, Shen GL, Yu RQ. 2009. A signal-amplified electrochemical immunosensor for aflatoxin B1 determination in rice. *Anal Biochem.* 387:82–86.
- Turner NW, Subrahmanyam S, Piletsky S. 2009. Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. *Anal Chim Acta.* 632:168–180.
- Ventura M, Guillén D, Anaya I, Broto-Puig F, Lliberia JL, Agut M, Comellas L, Rapad C. 2006. Ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry for the simultaneous analysis of aflatoxins B1, G1, B2, G2 and ochratoxin A in beer. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 20: 3199–3204.
- Wang JS, Kenler TN, Groopman JD. 1998. *Toxicants in food: fungal contaminants*. New York: Wiley, p. 29–57.
- Wejdan SK, Baharuddin S, Chew B, Nor HH, Abdussalam SMA, Muhammad IS, Salleh B. 2010. Determination of aflatoxins in animal feed by HPLC with multifunctional column clean-up. *Food Chem.* 118:882–886.
- Zollner P, Mayer Helm B. 2006. Trace mycotoxin analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatography–atmospheric pressure ionisation mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 1136:123–169.

**Analysis of bisphenol A in milk by using a multicommutated
fluorimetric sensor**

Talanta, in press (DOI: 10.1016/j.talanta.2012.02.021)

G Model

TAL-12793; No. of Pages 7

ARTICLE IN PRESS

Talanta xxx (2012) xxx–xxx



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Talanta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/talanta

Analysis of Bisphenol A in milk by using a multicommutated fluorimetric sensor

Lucía Molina-García, M^a Luisa Fernández-de Córdoba, Antonio Ruiz-Medina*

Department of Physical and Analytical Chemistry University of Jaén, Campus Las Lagunillas s/n, 23071 Jaén, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Available online xxx

Keywords:

Bisphenol A
Sensor
Multicommutation
Fluorescence
Milk

ABSTRACT

Bisphenol A (BPA) is a polyphenol widely used in industry as an intermediate in the production of polycarbonate plastics and epoxy resins, which are applied to produce plastic food containers, inner surface coating of food and beverage cans. Hence, BPA can migrate from these containers and cans with epoxy coating into foods. It is dangerous taking into account that BPA is considered as a potential endocrine disruptor, which mimics the action of the hormone estrogen. The method here proposed for the determination of BPA involves the implementation of solid-phase spectroscopy (SPS) in an automatic flow system. With this purpose, the measurement of the native fluorescence of BPA, retained on C₁₈ silica gel together with the implementation of multicommutation have been employed for its determination in different types of milk. The analytical measurements were made at 271/305 nm ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$) obtaining a detection limit (LOD) of 0.06 ng mL⁻¹. The pre-cleaning procedure and the posterior extraction with C₁₈ applied to the samples allowed the removal of proteins and the extraction of BPA from the matrix, respectively. The method showed an RSD lower than 6.0% ($n = 10$). BPA was determined in powdered milk, infant formula and pure liquid milk samples, being found in five samples at levels lower than the maximum residue limit (MRL) established by the European Union. In addition, a recovery study has been carried out where values close to 100% were observed in all cases, so demonstrating that the proposed analytical method fulfills the requirements for its application in quality control analyses.

© 2012 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

Bisphenol A (2,2-bis(4-hydroxyphenyl)propane), known as BPA, is a chemical substance widely used in industry as a monomer in the production of epoxy resins and polycarbonate plastics (PC), and as an antioxidant in PVC plastics [1,2]. PC are used in food storage containers such as water bottles and baby bottles, while epoxy resins are used as inner surface coating of food and beverage containers and cans, in order to protect the food from the direct contact with metal. Therefore, BPA can inevitably migrate into foodstuffs and beverages from packing of product, and then humans may routinely ingest trace amounts of BPA. In fact, BPA residues have been detected in wine, mineral water and different foodstuffs. Health risks can result from exposure to doses [3] much lower than the limit of 5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ body weight day⁻¹. BPA can potentially interfere with the endocrine system of wildlife and human, increase the cancer rate, reduce immune function and impair reproduction [4]. Its estrogenic action has been shown both *in vitro* and *in vivo* experiments [5]. Hence, the potential effects of BPA in human health through beverage and food consumption have become a growing concern.

The presence of BPA in complex foodstuff samples, or environmental and biological samples, is normally in trace amounts. Levels found indicate very low concentrations in most of the cases, below MRL established by the European Union Legislation. For this reason, several preconcentration and/or clean-up techniques including electrophoresis [6], solid-phase extraction (SPE) [7], molecularly imprinted solid-phase extraction (MISPE) [8] and matrix solid phase dispersion (MSPD) [9] have been proposed for using prior to its determination. To date, analysis of BPA has mainly been accomplished by gas chromatography (GC) [10–13] and liquid chromatography (LC) [14–17] both coupled to mass spectrometry (MS). These chromatographic methods show high sensitivity but they are time-consuming and expensive. In addition, complicated instruments and skilled operators are required, which makes their popularization difficult. Other classic analytical techniques such as luminescence [18,19] and electrochemical [20,21] detection have also been employed for the analysis of BPA. Taking into account the important environmental and health problem originated by the presence of BPA in different matrices, the complexity of these latter and the low concentrations to be analyzed, it is of primary interest the development of analytical methods with quick response, cheap instrument, low consumption of reagents, simplified operation and time-saving. Therefore, there is need for researching and revising of existing methods in order to have reliable tools for risk assessment and control of human exposure to this compound.

* Corresponding author. Tel.: +34 953 212759; fax: +34 953 212940.
E-mail address: anruiz@ujaen.es (A. Ruiz-Medina).

BPA manifests weak fluorescence property in aqueous solution because of its low fluorescent efficiency. With the purpose of overcoming this problem, the use of cyclodextrin complexes has been proposed [18]. In this paper, we propose a new alternative to that one previously reported, the use of solid-phase spectroscopy (SPS). In this technique, proposed by Yoshimura et al. [22], the combined use of an active solid support to retain the species of interest and the direct measurement of its emission once retained on the solid phase allows the improvement of both sensitivity and selectivity. Separation and preconcentration steps occur simultaneously with detection. Sensitivity is easily increased, when comparing with conventional fluorimetric methods in solution, due to the preconcentration of BPA on an appropriate solid support. In addition, the exclusion from this latter of other co-existing species of the matrix originates an improvement in selectivity. To date, different methodologies have been employed in SPS, but nowadays flow methodologies are the most widely used [23–25]. Several modifications to conventional flow injection analysis (FIA) [26] have been introduced in flow systems to obtain complete miniaturization, automation, high repeatability and low reagent consumption. One of these modifications has been multicommutation [27], which consists of the employment of discrete commutation devices to build up dynamic manifolds that can be easily reconfigured by software, being insertion volumes replaced with insertion times. Among the multicommutated flow techniques, multicommutated flow analysis (MCFIA) has been chosen for the development of the analytical method here proposed. MCFIA systems are typically constituted by a peristaltic pump and a set of three-way solenoid valves, automatically controlled by appropriate software, which can be arranged creating a flow network [28]. Each valve can adopt two positions, “On” and “Off”, being the whole system assimilated to an electronic circuit with a variable number of active nodes. This approach increases the versatility of the system, allowing its complete reconfiguration without its physical alteration, by just changing the valve operation in the computer [29].

The aim of this work was to develop a sensitive, selective, automatic and reproducible analytical strategy for determining BPA contents in milk by using an automatic fluorimetric sensor. To the best of our knowledge, only chromatographic methods have been proposed to the determination of BPA in this matrix [9,12,15], being the method here proposed the first one based on the measurement of its native fluorescence. The optimization of the multicommutated system, coupled to SPS methodology, just as all the variables influencing the analytical signal are described. The developed method has been conveniently validated and applied to the determination of BPA in powdered milk, infant formula and pure liquid milk samples.

2. Experimental

2.1. Apparatus and instrumentation

A Varian Cary-Eclipse Luminescence Spectrometer (Varian Inc., Mulgrave, Australia) was used for recording spectra and making fluorescence measurements. It was controlled by a microprocessor fitted with a Cary-Eclipse (Varian) software package for data collection and treatment. The following instrumental parameters were employed: excitation and emission slit widths were set at 20 and 10 nm, respectively and photomultiplier voltage was 720 V. The excitation and emission wavelengths established were 271/305 nm, respectively. UV-visible spectra were recorded with a Varian Cary 50 Spectrophotometer (Madrid, Spain) controlled by means of a PC fitted with the Varian computerized spectroscopy software, WIN-UV. A 100-QS Hellma cell with a light path length of 10 mm was employed in this last instrument.

The multicommutated flow system is shown in Fig. 1. This was built with a four channel Gilson Minipuls-3 (Villiers Le Bell, France) peristaltic pump fitted with a rate selector and pump tubing type Solvflex (Elkay Products, Shrewsbury, MA, USA), three 161T031 NResearch three-way solenoid valves (Neptune Research, MA, USA) and an electronic interface based on ULN 2803 integrate circuits. The valves were operated at an electric potential of 12 V and a direct current of 100 mA. PTFE tubing (0.8 mm i.d.) and methacrylate connections were also used. The software for controlling the system was developed in Visual Basic 6.0 by our research group. A 176.752-QS Hellma flow cell (Müllheim, Baden, Germany) (inner volume, 25 μ L; light path length, 1.5 mm) filled with C_{18} silica gel was used in the detection area. The solid support was loaded as methanol slurry just up to a height which enabled the light beam to pass completely through the solid phase and the outlet was locked with glass wool, to avoid the beads movement and allow the continuous flow. All the experiments were carried out at room temperature.

Other apparatus consisted of a vacuum system 12-port Visiprep SPE Vacuum Manifold (Supelco, Bellefonte, PA), a Crison Model 2002 pH-meter with a glass/saturated calomel combination electrode (Crison, Barcelona, Spain) and a Selecta Ultrasons ultrasonic bath (Barcelona, Spain).

2.2. Reagents and solutions

All reagents were of analytical reagent grade and ultrapure water obtained from a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA) was used throughout.

BPA was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). The stock standard solution (120 mg L^{-1}) was prepared by dissolving the analyte in 40% (v/v) methanol solution. It was kept away from light and stored at 4 °C in a refrigerator, remaining stable for at least 4 weeks. Working standard solutions were prepared daily by taking an aliquot of the stock solution and diluting with 0.08 mol L^{-1} sodium acetate/acetic acid (NaAc/HAc) buffer solution, pH 6.0. The carrier solution, 60% (v/v) methanol solution, was prepared by dissolving the required volume of methanol in ultrapure water. C_{18} bonded phase silica gel beads (55–105 μ m average particle size) (Waters, Milford, MA, USA) were used as active solid support in the detection area. Cation and anion exchangers (Sephadex SP C-25, Sephadex CM C-25, Sephadex QAE A-25 and Sephadex DEAE A-25, all of them having 40–120 μ m average particle size) (Sigma, Alcobendas, Madrid, Spain) were also tested for the retention of BPA.

Methanol, NaAc, HAc and trichloroacetic acid (TCA) were obtained from Panreac (Barcelona, Spain). Octadecyl (C_{18}) Sep-Pak Vac 6 mL (500 mg) SPE cartridges (Waters, Ireland) and 0.20 μ m nylon filters (Millipore Corporation, Bedford, MA) were also used for SPE procedure.

2.3. Samples treatment

Milk samples were purchased from local markets. Protection against light was kept during all the process, keeping the samples in darkness at 4 °C.

2.3.1. Pre-cleaning of the sample

A previous clean-up step was carried out in samples in order to improve the subsequent extraction of BPA. For this, 20 mL of liquid milk (milk/infant formula milk) or 1 g of powder (powdered milk/infant formula milk), this latter suspended in 10 mL of water, were spiked with an appropriate amount of BPA and proteins were removed from the matrix by adding 2.5% (v/v) TCA solution. Finally, after being shaken for 30 s, the samples were centrifuged for 3 min (4200 rpm) and the supernatant was collected.

GModel

TAL-12793; No. of Pages 7

ARTICLE IN PRESS

L. Molina-García et al. / Talanta xxx (2012) xxx–xxx

3

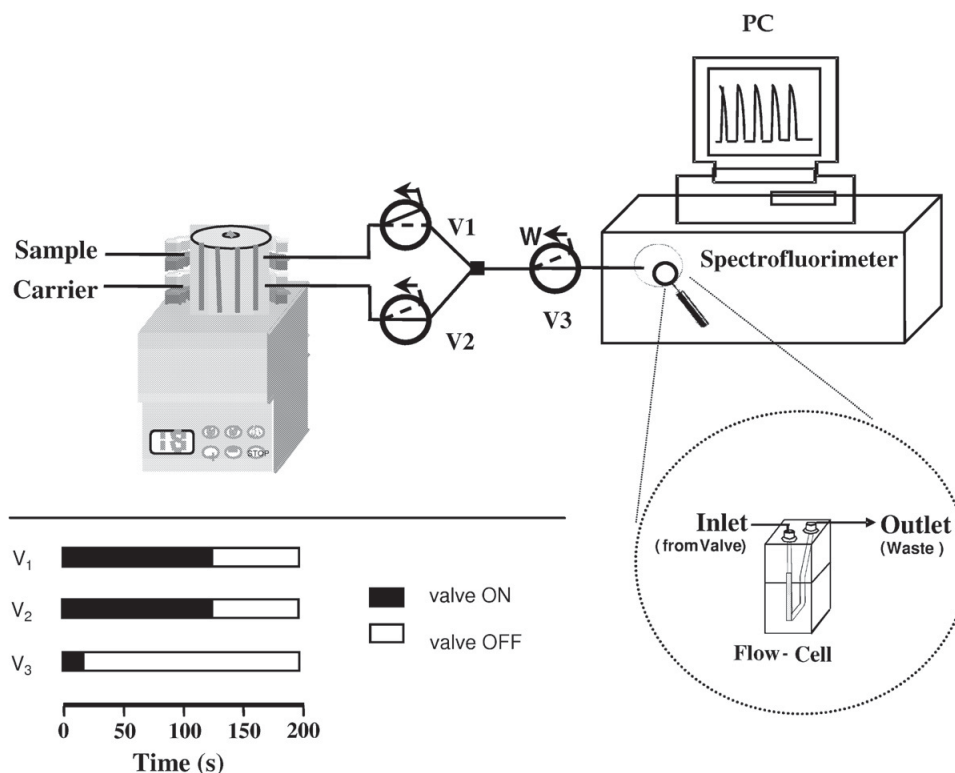


Fig. 1. Multicommutated flow-injection system. Carrier solution (60% (v/v) methanol solution); V₁, V₂ and V₃ are three-way solenoid valves; flow cell filled with C₁₈ silica gel; flow rate, 1.7 mL min⁻¹; sampling time, 110 s. For each solenoid valve, the solid and dotted lines refer to "Off" and "On" positions, respectively. The scheme at the lower part shows the valve time program.

2.3.2. Extraction of BPA

C₁₈ cartridges were previously conditioned by passing consecutively 5 mL of methanol and 5 mL of water and, subsequently, cleaned milk samples were loaded onto the column at a flow-rate of 3–4 mL min⁻¹ under vacuum. Then, the cartridges were washed with 2 mL of 30% (v/v) methanol solution and vacuum dried for 1 min. Finally, BPA retained in the cartridges was eluted with 3 mL of 80% (v/v) methanol solution and the eluate was concentrated to dryness under a gentle stream of nitrogen. The final residue was reconstituted to 10 mL with 0.08 mol L⁻¹ NaAc/HAc buffer solution (pH 6.0).

2.4. Procedure

The flow network is shown in Fig. 1. In the initial status, all valves were switched off and the carrier solution, 60% (v/v) methanol solution, flowed through the system while the sample solution was recycled to its vessel. In this way a stable baseline was recorded. Next, valves V₁, V₂ and V₃ were switched on for 125, 125 and 15 s, respectively. Thus the sample solution circulated through the system, whereas the carrier solution was recycled to its recipient. For the first 15 s of this step, the sample plug was directed toward the waste through V₃, so cleaning the tubing between V₁ and V₃ with the new sample solution. Over the next 110 s the sample plug was pumped toward the detection area. When BPA reached the detection area, it was temporarily retained on the solid support (C₁₈ silica gel) and monitored (271/305 nm, λ_{ex}/λ_{em}). Then, the solid support was regenerated by the carrier solution itself and the system was

prepared for the next insertion of sample. All experiments were carried out in triplicate, and the results are expressed as peak height mean values.

3. Results and discussion

3.1. Optimization of BPA extraction

In order to both to extract BPA from milk and recover high amounts of this latter, a previous clean-up step was necessary to remove proteins. This was carried out by following a procedure previously described by Ji et al. [30]. In this latter the proteins were precipitated with 2.5% (v/v) TCA and the precipitate was rinsed with methanol to avoid the adsorption of BPA onto it.

Next, the optimization of the SPE procedure developed for the extraction of BPA from milk samples is described. Solutions with different percentages of methanol (v/v) were tested for the rinsing and elution steps. With this purpose, the washout fractions were monitored with a UV-spectrophotometer from 250 to 425 nm. Firstly, aqueous solutions containing different methanol percentages (10, 20, 30, 40 and 50% (v/v)) were assayed for the removal of potential interfering more polar compounds from the cartridge. 2 mL of a 30% (v/v) methanol solution proved to be the optimal one for this purpose, providing an optimal elimination of other species of the matrix without the elution of BPA. Secondly, methanol solutions with concentrations ranging from 70 to 100% (v/v) were tested for the elution of BPA. An 80% (v/v) methanol solution (3 mL)

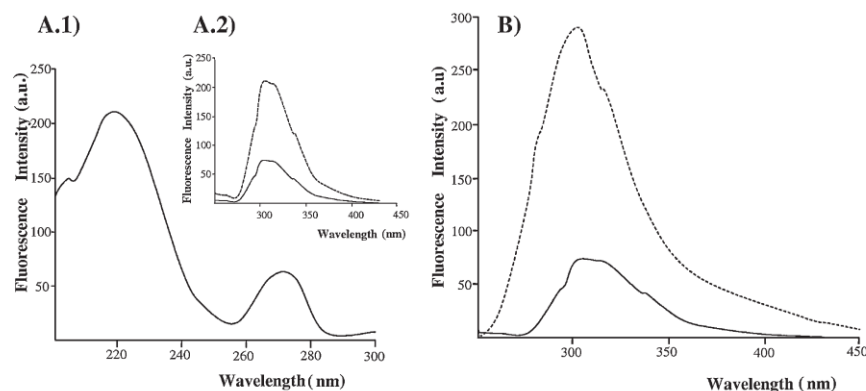


Fig. 2. (A.1) Excitation fluorescence spectra of 28 ng mL⁻¹ BPA in homogeneous solution ($\lambda_{em} = 305$ nm). (A.2) Emission fluorescence spectra of 28 ng mL⁻¹ BPA in homogeneous solution ($\lambda_{ex} = 221$ nm (dashed line) and $\lambda_{ex} = 271$ nm (continuous line)). (B) Emission fluorescence spectra of BPA in homogeneous solution (continuous line) and retained on C₁₈ silica gel (dashed line), 28 ng mL⁻¹ of BPA (homogeneous solution); 3.5 ng mL⁻¹ of BPA (solid phase); $\lambda_{ex} = 271$ nm.

was selected for this purpose, since it provided a good recovery (90–100%) of the BPA amounts assayed.

3.2. Spectral characteristics and selection of the solid support

Spectra of BPA in aqueous solution and in solid phase were obtained in order to select the working wavelengths. The fluorescence spectra in aqueous solution show two maximum excitation wavelengths at 221 and 271 nm, and one maximum emission wavelength at 305 nm (Fig. 2A.1). The fluorescence signal obtained for 221 nm excitation wavelength was 3-fold higher than that obtained for 271 nm (Fig. 2A.2). With the purpose of improving both sensitivity and selectivity of the determination of BPA, several tests of sorption on different solid supports were carried out. The retention assays were performed at different pH values and with anion-exchangers (Sephadex QAE A-25, and Sephadex DEAE-25), cation-exchangers (Sephadex SP C-25 and Chelex 100) and non-ionic supports (C₁₈ silica gel). In the case of cationic-exchangers, the analytical signal obtained was very low due to the weak retention of BPA, which was expected taking into account its structure. Due to the high value of its pK_a , 10.3, [31], BPA could ionize under conditions of high pH and to be retained on an anion-exchanger through its hydroxyl groups. Although this fact could be checked, the pH value necessary for the retention of BPA on the anionic resins assayed was very high and close to their limit working pH (around 11.0). Therefore, the use of this type of exchangers was discarded. C₁₈ silica gel provided a strong retention of the analyte. Due to the BPA also could be eluted from this solid support, it was selected for retention purposes. The emission spectra of BPA retained on C₁₈ silica gel ($\lambda_{ex} = 221$ nm or $\lambda_{ex} = 271$ nm) showed maxima at the same wavelengths than those in homogeneous solution and, in both cases, an important improvement in the fluorescence signal was obtained. However, for $\lambda_{ex} = 221$ nm the background fluorescence signal of the solid support was so high that it was not possible to carry out the analytical measurements. Therefore, 271/305 nm were finally chosen as excitation and emission wavelengths, respectively. As a result of the pre-concentration process of BPA on the active sensing area, a 33-fold increase in the signal was obtained when SPS methodology was used (Fig. 2B).

The emission and excitation slits as well as filters ranges were established providing the best sensitivity. The selected excitation and emission slits were 20 and 10 nm, respectively. Filter ranges were set at 250–395 nm for both excitation and emission. These

values also supplied the best ratio between analytical signal and background noise. With the same criterion, the voltage of the photomultiplier tube was set at 720 V.

3.3. Chemical variables

The chemical variables studied were the nature of the carrier, eluting and sample solutions.

Taking into account the non-polar nature of the C₁₈ silica gel support, methanol solution was used for BPA elution purposes in the previously described tests of sorption. Due to the good results obtained with this solvent, the carrier solution was prepared with methanol in water and its concentration was tested in the range from 10 to 80% (v/v). The results obtained showed that concentrations of methanol lower than 60% (v/v) did not allow a complete and quick elution of BPA from the solid support. On the other hand, a slight decrease in the fluorescence signal was obtained with increasing methanol concentrations. For methanol concentrations ranging from 60 to 80% (v/v) the carrier solution itself quickly eluted BPA from the solid support. Therefore, 60% (v/v) methanol solution was selected as carrier solution, since provided both a high analytical signal and a quick and complete regeneration of the solid phase. Although the use of a carrier solution with methanol concentration lower than 60% (v/v) combined with the introduction in the flow system of an additional eluting solution was also tested, as an alternative to the use of a carrier/eluting solution, it did not provide a significant improvement in sensitivity or sample throughput.

The optimum pH of sample solution was also studied. In order to optimize this variable, standard solutions with a constant BPA concentration and different pH values (from 2.0 to 9.0), adjusted with nitric acid or sodium hydroxide solutions, were injected in the system and the corresponding analytical signals were recorded. No significant variations in the fluorescence signals were observed in the assayed pH range. Because the pH of milk is around 6.0, this value was chosen as working pH for further experiments. Several buffer solutions at pH 6.0 were tested in order to adjust the pH of the sample solution (citric acid/sodium hydroxide, sodium dihydrogen phosphate/sodium hydroxide and NaAc/HAc). The best results were achieved with NaAc/HAc buffer solution. The influence of its concentration on the analytical response was assayed in the range of 0.005–0.1 mol L⁻¹. Finally, a 0.08 mol L⁻¹ NaAc/HAc solution was chosen for buffering the sample since it provided the highest analytical signal.

Table 1
Analytical parameters.

Parameter	Value
Linear dynamic range/ng mL ⁻¹	0.2–5.0
Calibration graph	
Intercept	34.32 ± 0.03
Slope/mL.ng ⁻¹	72.73 ± 0.08
Correlation coefficient	0.9985
Detection limit/ng mL ⁻¹	0.06
Quantification limit/ng mL ⁻¹	0.2
RSD (%) ^a	
Intra-day	3.4 ^b
Inter-day	5.7 ^b
Sampling frequency/h ⁻¹	30

^a n = 10.^b [BPA] = 4 ng mL⁻¹.

3.4. Flow variables

The effect of both the flow-rate and the sampling time were the flow variables studied.

The influence of the flow-rate was investigated from 0.5 to 2 mL min⁻¹. A slight decrease in the fluorescence signal was obtained for increasing flow-rates, although the sampling frequency increased. On the other hand, flow-rates higher than 1.7 mL min⁻¹ originated overpressure problems in the flow system. Finally, this flow-rate value was chosen as a compromise between sensitivity and throughput.

In multicommutation, sample volumes are replaced by times of insertion (known the flow-rate and the time of insertion, the volume can be easily calculated). When the time of insertion of sample was increased in the proposed system (20–120 s) the analytical signal increased, because of a larger amount of BPA was retained on the solid support. This feature allows both the enhancement of sensitivity by increasing the time of insertion and the reduction of strong matrix effects by means of a previous dilution of the sample before its insertion in the system. Fig. 3 shows the influence of this variable in the recorded signal. The increase of the fluorescence signal with the time of insertion was linear up to 110 s (3.1 mL). Finally, this time of insertion was selected for further experiments since higher values did not provide a significant increment in sensitivity and the sampling frequency decreased.

3.5. Figures of merits

Following the optimized working conditions above described, the calibration curve for BPA was obtained by standard addition calibration method, due to the existence of a considerable matrix effect. Analytical parameters are shown in Table 1. Quantification was carried out by using peak height as analytical signal. Data were fitted by standard least-squares treatment. The proposed methodology responds linearly in the concentration range 0.2–5.0 ng mL⁻¹. The standard deviations of intercept and slope were also calculated (average of three determinations). Detection limit (LOD) and quantification limit (LOQ) were estimated as the concentration that produced a fluorescence signal equal to three and ten times the standard deviation of background fluorescence, respectively [32]. A LOD as low as 0.06 ng mL⁻¹ was obtained. Therefore, the method exhibits a LOD lower than those ones reported for HPLC methods with UV [30] or fluorescence detection [33,34].

The reproducibility and robustness of the method were also studied, using a commercial milk sample. The reproducibility was assessed by comparison of the intra- and inter-day assay results undertaken by two analysts. The RSD values (%) for intra- and inter-day assays did not exceed 4.0 and 6.0%, respectively. The robustness of the method was investigated under a variety of conditions such as small changes in the concentration of NaAc/HAc in the sample

Table 2
Determination of BPA in milk samples.

Sample	Type	State	Found ± σ ^a (ng mL ⁻¹)
1	A ₁	Liquid	2.26 ± 0.01
2	A ₂	Liquid	<LOD
3	A ₃	Liquid	5.47 ± 0.04
4	A ₄	Liquid	<LOD
5	A ₅	Liquid	<LOD
6	A ₆	Liquid	0.38 ± 0.06
7	B ₁	Solid (powdered)	<LOD
8	B ₂	Solid (powdered)	<LOD
9	B ₃	Liquid	6.31 ± 0.03
10	B ₄	Liquid	<LOD
11	B ₅	Liquid	1.26 ± 0.03
12	C ₁	Solid	<LOD
13	C ₂	Solid	<LOD
14	C ₃	Solid	<LOD

A, pure milk; B, infant formula; C, powdered milk.

^a Average of three replicates.

solution (0.05–0.1 mol L⁻¹) and in the flow rate (1.5–1.9 mL min⁻¹). In all the cases, the BPA recoveries were in the 94–105% range (considering 100% the recovery value obtained under the optimum conditions), so demonstrating the robustness of the proposed method.

3.6. Analytical applications

The developed sensor was applied to the determination of BPA in several milk samples. The pre-treatment and procedure described in Sections 2.3 and 2.4 were used in each instance. In spite of the removal of proteins and other species of the matrix carried out in the sample treatment, a positive matrix effect was noticed which was evaluated by comparing the slopes of aqueous standards and standard addition calibration curves for different milk samples ($m_{\text{standard addition}}/m_{\text{standard}} \approx 1.3$). The slope of the calibration curve obtained by spiking the final milk extracts with BPA was different to that obtained by spiking the original sample and both of them were different than that obtained by external calibration. This fact is due to the presence in the final extracts of interfering species and the incomplete recovery of BPA in the SPE procedure. Consequently, the calibration curves were constructed with matrix-matched standards, that is, the analysis was carried out by spiking different aliquots of a milk sample with increasing amounts of analyte.

Fourteen commercially available milk samples, with different presentations, were analyzed with the proposed method (Table 2). BPA was found in three of the six pure liquid milk samples (0.38, 2.26 and 5.47 ng mL⁻¹) and two of the liquid infant formula samples (6.31 and 1.26 ng mL⁻¹). Nevertheless, BPA was not detected in solid infant formula or powdered milk products. Migration of BPA from cans into solid products is unlikely because those usually are not coated and, even if there is a coating inside, migration will be extremely slow compared to that for the liquid products. BPA concentrations in all of the milk samples studied were in the range 0.38–6.31 ng mL⁻¹ (about 0.37–6.13 μg kg⁻¹). These results are in agreement with previous studies that report BPA concentration between 0.28 and 2.92 ng g⁻¹ [35] and 1.7 and 15.2 ng g⁻¹ [15]. In all cases, the obtained concentrations were lower than the MRL established by the European Union for BPA content in milk (0.6 mg kg⁻¹) [36]. However, the low BPA concentrations found are not reassuring enough if we consider the long shelf-life of infant formula and powder milks as well as their lipid content (especially in infant formula), that increase the migration from packaging toward the sample. For this reason, determination of BPA in milk samples is essential, considering that its estrogenic activity at low levels is under discussion and that milk is the main nourishment of babies.

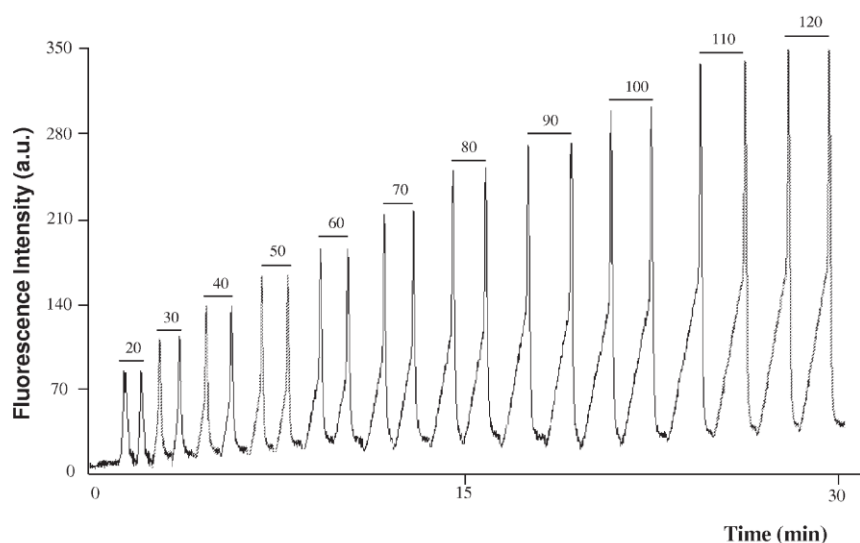


Fig. 3. Influence of the sampling time in the fluorescence intensity. 4 ng mL⁻¹ BPA; pH 6.0; flow-rate, 1.7 mL min⁻¹. Sampling time ranging from 20 s to 120 s.

Table 3

Recovery study of BPA in milk samples.

Sample	Proposed method		Reference method	t_{calc}^b	F_{calc}^c
	Added (ng mL ⁻¹)	Found $\pm \sigma^a$ (ng mL ⁻¹)	Found $\pm \sigma^a$ (ng mL ⁻¹)		
A ₆ (pure liquid milk)	–	0.38 \pm 0.06	0.40 \pm 0.03	0.55	4.00
	0.5	0.91 \pm 0.08	0.90 \pm 0.05	0.18	2.56
	2.0	2.21 \pm 0.03	2.31 \pm 0.08	2.03	0.14
	5.0	5.36 \pm 0.05	5.26 \pm 0.04	2.44	1.56
B ₃ (infant formula)	–	6.31 \pm 0.03	6.29 \pm 0.06	0.51	0.25
	5.0	12.03 \pm 0.06	11.75 \pm 0.06	0.40	1.00
	10.0	16.36 \pm 0.09	16.50 \pm 0.04	2.44	5.06
	20.0	26.50 \pm 0.07	26.38 \pm 0.05	2.44	1.96
B ₁ (infant formula)	–	<LOD	<LOD	–	–
	1.0	1.11 \pm 0.08	1.10 \pm 0.04	0.19	4.00
	2.5	2.48 \pm 0.06	2.52 \pm 0.02	1.10	2.25
C ₂ (powdered milk)	–	<LOD	<LOD	–	–
	1.0	1.04 \pm 0.05	0.95 \pm 0.03	2.67	2.77
	5.0	5.10 \pm 0.05	4.99 \pm 0.05	2.68	1.00
	10.0	9.98 \pm 0.06	10.13 \pm 0.08	2.61	0.56

^a Average of three replicates.

^b Theoretical value 2.772 ($p=0.05$).

^c Theoretical value 39.00 ($p=0.05$).

In order to demonstrate the accuracy of the proposed method, a recovery study at three concentration levels on both two of the samples containing BPA and two of the samples no-containing this latter was also performed. The obtained results are summarized in Table 3. In all cases good recoveries, ranging from 93 to 106% were achieved. The applicability of the proposed method to the analysis of BPA in milk was demonstrated by comparison of the results obtained with those found with a reference method [15] based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry. The statistical study of precision and accuracy of both the proposed and the reference method was performed from F criterion and the t test, respectively [37]. The results show that there is no significant statistical difference between the values obtained by both methods, so indicating the utility of the proposed method for BPA routine analytical control.

4. Conclusions

BPA, a known endocrine disruptor, can be found in milk and dairy products due to the contact with plastic materials or epoxy resins during food processing and storage. Therefore, there is a strong need for specific studies on the levels of migration of BPA in these samples and, consequently, for the development of sensitive and quick analytical methods for its determination. The multicommutated flow sensor here developed, based on the measurement of the fluorescence native of BPA, allows the determination of this compound in milk at concentration levels of 0.2 ng mL⁻¹ (0.19 $\mu\text{g kg}^{-1}$) (LOQ), very lower than the MRL established by European Union (0.6 mg kg⁻¹). The application of multicommutation principles drastically reduces the consumption of reagents and human intervention compared to FIA or SIA methodologies. Taking

GModel

TAL-12793; No. of Pages 7

ARTICLE IN PRESS

L. Molina-García et al. / Talanta xxx (2012) xxx–xxx

7

into account all these features and, in addition, the simplicity of the system used and the high throughput, the method here proposed can be considered as a suitable alternative to chromatographic methods, being appropriate for routine analysis in the control of BPA residues in milk.

Acknowledgements

The authors acknowledge the financial support from “Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa” (Junta de Andalucía), Project P07-FQM-02673. L.M.G. also acknowledges research fellowship from Spanish MEC.

References

- [1] European Directive 2002/72/EC, Amendment 2004/19/EC.
- [2] Scientific Committee on Food, Opinion of the Scientific Committee on Food on Bisphenol A, SCF/CS/PM/3936, Brussel, 2002.
- [3] F.S. Vom Saal, W.V. Welshons, Environ. Res. 100 (2006) 50–76.
- [4] S.H. Safe, Environ. Health Perspect. 108 (2000) 487–493.
- [5] N. Suzuki, A. Hattori, Life Sci. 73 (2003) 2237–2247.
- [6] H. Gallart-Ayala, O. Nuñez, E. Moyano, M.T. Galceran, Electrophoresis 31 (2010) 1550–1559.
- [7] T. Wu, W.Y. Wang, L.M. Jiang, Q.C. Chu, J. Delaire, J.N. Ye, Chromatographia 68 (2008) 339–344.
- [8] S. Mei, D. Wu, M. Jiang, B. Lu, J.M. Lim, Y.K. Zhou, Y.I. Lee, Microchem. J. 98 (2011) 150–155.
- [9] B. Shao, H. Han, X. Tu, L. Huang, J. Chromatogr. B 850 (2007) 412–416.
- [10] S. Morales-Muñoz, J.L. Luque García, M.J. Ramos, A. Fernández-Alba, M.D. Luque de Castro, Anal. Chim. Acta 552 (2005) 50–59.
- [11] X. Peng, Z. Wang, C. Yang, F. Chen, B. Mai, J. Chromatogr. A 1116 (2006) 51–56.
- [12] H.W. Kuo, W.H. Ding, J. Chromatogr. A 1027 (2004) 67–74.
- [13] T. Geens, H. Neels, A. Covaci, J. Chromatogr. B 877 (2009) 4042–4046.
- [14] J.D. Stuart, C.P. Capulong, K.D. Launer, X. Pan, J. Chromatogr. A 1079 (2005) 136–145.
- [15] N.C. Maragou, E.N. Lampi, N.S. Thomaidis, M.A. Koupparis, J. Chromatogr. A 1129 (2006) 165–173.
- [16] Y. Watabe, T. Kondo, M. Morita, N. Tanaka, J. Haginaka, K. Hosoya, J. Chromatogr. A 1032 (2004) 45–49.
- [17] X. Ye, Z. Kuklennyik, L.L. Needham, A.M. Calafat, J. Chromatogr. B 831 (2006) 110–115.
- [18] X. Wang, H. Zeng, L. Zhao, J.M. Lin, Anal. Chim. Acta 556 (2006) 313–318.
- [19] C. Lu, J. Li, Y. Yang, J.M. Lin, Talanta 82 (2010) 1576–1580.
- [20] F. Wang, J. Yang, K. Wu, Anal. Chim. Acta 638 (2009) 23–28.
- [21] J. Huang, X. Zhang, Q. Lin, X. He, X. Xing, H. Huai, W. Lian, H. Zhu, Food Control 22 (2011) 786–791.
- [22] K. Yoshimura, H. Waki, S. Ohashi, Talanta 23 (1976) 449–454.
- [23] M.J. Ruedas Rama, A. Ruiz Medina, A. Molina Díaz, Talanta 66 (2005) 1333–1339.
- [24] L. Molina-García, E.J. Llorent-Martínez, M.L. Fernández-de Córdova, A. Ruiz-Medina, Talanta 79 (2009) 627–632.
- [25] E.J. Llorent-Martínez, P. Ortega-Barrales, M.L. Fernández-de Córdova, A. Ruiz-Medina, Anal. Bioanal. Chem. 394 (2009) 845–853.
- [26] J. Ruzicka, E.H. Hansen, Anal. Chim. Acta 78 (1975) 145–157.
- [27] F.R.P. Rocha, B.F. Reis, E.A.G. Zagatto, J.L.F.C. Lima, R.A.S. Lapa, J.L.M. Santos, Anal. Chim. Acta 468 (2002) 119–131.
- [28] E.J. Llorent-Martínez, P. Ortega-Barrales, M.L. Fernández-de Córdova, A. Ruiz-Medina, Curr. Pharm. Anal. 6 (2010) 53–65.
- [29] M. Catalá Icardo, J.V. García Mateo, J. Martínez Calatayud, TrAC: Trends Anal. Chem. 21 (2002) 366–378.
- [30] Y. Ji, J. Yin, Z. Xu, C. Zhao, H. Huang, H. Zhang, C. Wang, Anal. Bioanal. Chem. 395 (2009) 1125–1133.
- [31] M. Clara, B. Strenn, E. Saracevic, N. Kreuzinger, Chemosphere 56 (2004) 843–851.
- [32] D. MacDougall, W.B. Crummett, Anal. Chem. 52 (1980) 2242–2249.
- [33] X. Liu, Y. Ji, H. Zang, M. Liu, Food Addit. Contam. 25 (2008) 772–778.
- [34] Y. Sun, M. Irie, N. Kishikawa, M. Wada, N. Kuroda, K. Nakashima, Biomed. Chromatogr. 18 (2004) 501–507.
- [35] N. Casajuana, S. Lacorte, J. Agric. Food Chem. 52 (2004) 3702–3707.
- [36] Commission Directive 2004/19/EC, Off. J. Eur. Communities L71 (2004) 8–21.
- [37] L. Saunders, R. Fleming, Mathematics and Statistics, 2nd ed., Pharmaceutical Press, London, 1971, p. 192.