

**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA**

**NUEVAS ESTRATEGIAS METODOLÓGICAS
MEDIANTE IONES LANTÁNIDOS APLICABLES
AL ANÁLISIS DE RUTINA**

Tesis Doctoral presentada por
Rafael Carlos Rodríguez Díaz

Córdoba, Julio de 2006

TITULO: *Nuevas estrategias metodológicas mediante iones lantánidos aplicables al análisis de rutina*

AUTOR: *Rafael Carlos Rodríguez Díaz*

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2010
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es

ISBN-13: 978-84-693-8928-7

Nuevas estrategias metodológicas mediante iones lantánidos aplicables al análisis de rutina

**NUEVAS ESTRATEGIAS METODOLÓGICAS MEDIANTE IONES
LANTÁNIDOS APLICABLES AL ANÁLISIS DE RUTINA**

LOS DIRECTORES

Fdo. Agustina Gómez Hens
Catedrático del Departamento
de Química Analítica de la
Universidad de Córdoba

Fdo. M^a de la Paz Aguilar Caballos
Ayudante L.O.U. del Departamento de
Química Analítica de la Universidad
de Córdoba

Trabajo presentado para optar al grado de
Doctor en Ciencias, Sección Químicas

Fdo. Rafael Carlos Rodríguez Díaz
Licenciado en Ciencias Químicas

Nuevas estrategias metodológicas mediante iones lantánidos aplicables al análisis de rutina

D^a Agustina Gómez Hens, Catedrático del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Córdoba, y D^a M^a de la Paz Aguilar Caballos, Ayudante L.O.U. del citado Departamento, en calidad de directores de la Tesis Doctoral presentada por el Licenciado en Ciencias Químicas Rafael Carlos Rodríguez Díaz.

CERTIFICAN: Que la Tesis Doctoral titulada “NUEVAS ESTRATEGIAS METODOLÓGICAS MEDIANTE IONES LANTÁNIDOS APLICABLES AL ANÁLISIS DE RUTINA” ha sido realizada en los laboratorios del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Córdoba y que, a su juicio, reúne todos los requisitos exigidos a este tipo de trabajos.

Y para que conste y surta los efectos pertinentes, expiden el siguiente certificado en Córdoba, a 10 de Mayo de 2006.

Fdo. A. Gómez Hens

Fdo. M^a de la Paz Aguilar Caballos

Nuevas estrategias metodológicas mediante iones lantánidos aplicables al análisis de rutina

Deseo expresar mi agradecimiento al Ministerio de Ciencia y Tecnología (Proyectos BQU2000-0905 y BQU2003-03027) y a la Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa de la Junta de Andalucía (Ayudas PAI 2002-2005) con cuya financiación he podido disfrutar de contratos de investigación durante mi período de formación y desarrollar las investigaciones presentadas en esta Memoria.

Nuevas estrategias metodológicas mediante iones lantánidos aplicables al análisis de rutina

Me gustaría empezar manifestando mi más sincero agradecimiento hacia mis directoras de Tesis, Dra. D^a Agustina Gómez Hens y Dra. D^a M^a de la Paz Aguilar Caballos, por haber confiado en mí para la realización de esta Tesis.

Tina, quisiera darte las gracias por haberme brindado la oportunidad de realizarme científicamente, así como por tus valiosos consejos y tu constante interés. M^a Paz, me gustaría agradecerte tu ayuda, dedicación y empeño en todo momento.

Al Dr. D. Juan Manuel Fernández, por su colaboración en la realización de esta Tesis.

A mis compañeros y amigos, Leo, Lourdes y Manuel por su constante ayuda.

A todos los demás miembros del Departamento de Química Analítica, que sin su apoyo y ayuda no habría sido posible la realización de esta Tesis Doctoral.

A todos ellos, mi más sincero agradecimiento.

Nuevas estrategias metodológicas mediante iones lantánidos aplicables al análisis de rutina

Y ante todo agradecerle a mi familia, en especial a mis padres, Juan y Antonia, a mi hermano y su novia, Juan Antonio y Ángela, por su constante apoyo, sus consejos e ilusión durante todo este tiempo.

Y a Eva Victoria, por su apoyo incondicional, su cariño y comprensión.

A ellos quiero dedicarles el esfuerzo y trabajo de varios años que han dado como fruto esta Tesis.

Nuevas estrategias metodológicas mediante iones lantánidos aplicables al análisis de rutina

ÍNDICE

Nuevas estrategias metodológicas mediante iones lantánidos aplicables al análisis de rutina

OBJETO	17
INTRODUCCIÓN	21
CAPÍTULO I. USO DE LA TECNOLOGÍA DE REACTIVOS	
SECOS	71
I.1. Introducción	75
I.2. Equipos y materiales	81
I.3. Procedimientos	84
I.4. Simultaneous determination of ciprofloxacin and tetracycline in biological fluids based on dual-lanthanide sensitised luminescence using dry reagent chemical technology	87
CAPÍTULO II. USO DEL IÓN TERBIO(III) COMO REACTIVO	
DERIVATIZANTE EN DISOLUCIÓN	113
II.1. Introducción	117
II.2. Equipos y materiales	136
II.3. Procedimientos	140
II.4. Sensitive determination of fluoroquinolone antibiotics in milk samples using time-resolved methodology	147
II.5. Chromatographic determination of flumequine in food samples by post-column derivatisation with terbium (III)	173

- II.6.** Determination of fluoroquinolones in milk samples by post-column derivatization liquid chromatography with luminescence detection 203
- II.7.** Determination of hydroxybenzoic acids and catechins in white wine samples by liquid chromatography with luminescence detection 231

CAPÍTULO III. USO DE LANTÁNIDOS A LARGA LONGITUD

- DE ONDA** 257
- III.1.** Introducción 261
- III.2.** Equipos y materiales 278
- III.3.** Procedimientos 280
- III.4.** Usefulness of ytterbium(III) as analytical reagent for total sulfite determination in white wine samples 283
- III.5.** Determination of soluble phosphates in water samples using ytterbium(III) and dynamic measurements of light scattering intensity at long wavelength 311

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 339

CONCLUSIONES 387

OBJETO

Nuevas estrategias metodológicas mediante iones lantánidos aplicables al análisis de rutina

El objetivo básico de las investigaciones que constituyen esta Memoria ha sido contribuir al desarrollo de métodos analíticos, basados en el uso de iones lantánidos como reactivos, fácilmente aplicables al análisis de rutina. Para alcanzar este objetivo, se ha buscado conseguir los niveles de sensibilidad y selectividad adecuados para que la determinación de los analitos se realice evitando tratamientos de muestra lentos y complejos. Con este fin se han planteado los siguientes objetivos concretos:

- Desarrollo de métodos analíticos para la determinación simultánea de especies basados en la tecnología de reactivos secos y en el uso de dos iones lantánidos.
- Utilización del ión terbio(III) como reactivo derivatizante en cromatografía líquida para la determinación de quinolonas y de compuestos fenólicos.
- Estudio de la utilidad del ión iterbio(III) como reactivo analítico para la determinación de aniones inorgánicos, como sulfitos y fosfatos, basada en medidas dinámicas de la dispersión de la radiación a larga longitud de onda.

Nuevas estrategias metodológicas mediante iones lantánidos aplicables al análisis de rutina

INTRODUCCIÓN

Nuevas estrategias metodológicas mediante iones lantánidos aplicables al análisis de rutina

La elevada sensibilidad de las técnicas fotoluminiscentes es una característica que ha propiciado su amplia utilización para obtener información analítica sobre compuestos orgánicos, ya que permiten alcanzar límites de detección relativamente bajos. Aunque la utilidad de estas técnicas puede estar frecuentemente limitada por problemas de selectividad, esta propiedad analítica puede mejorarse mediante diversas estrategias, las cuales reducen algunas limitaciones ya conocidas tales como solapamiento espectral, dispersión de la radiación, fenómenos de inhibición o señales de fondo procedentes de la muestra. Una de estas estrategias, que ha atraído un interés especial, implica la utilización de iones lantánidos como reactivos, lo que ha dado lugar a una variedad de aplicaciones químicas y biológicas. Estos iones forman quelatos con propiedades luminiscentes especiales como resultado de un proceso de transferencia de energía intramolecular eficaz desde el estado triplete excitado del ligando hasta el nivel de emisión del ión lantánido [1]. Este tipo de luminiscencia sensibilizada es un proceso rápido en el que el lantánido se combina con el ligando (especie dadora) mediante enlace coordinado. Tan sólo en algunos casos, se ha descrito un tipo de transferencia de energía controlada por difusión, a partir del estado excitado de un compuesto orgánico sin formar complejo con el ión lantánido [2,3], que suele ser menos eficaz.

Existe una diferencia crucial entre la luminiscencia sensibilizada de lantánidos y la fosforescencia sensibilizada a temperatura ambiente (SRTP). En esta última, las especies que experimentan un cruce intersistemas eficaz desde el estado singlete al triplete, pueden transferir su energía desde éste a un compuesto aceptor de energía, como biacetilo o 1,4-dibromonaftaleno, dando lugar al paso del aceptor a su estado triplete excitado, con la consiguiente emisión de fosforescencia. Dado que éste es un proceso de transferencia de energía intermolecular, su velocidad y eficacia son menores que cuando dicha transferencia es intramolecular, como ocurre con los iones lantánidos. Además, es imprescindible la desoxigenación para obtener con éxito SRTP en disolución, ya que el oxígeno inhibe tanto la formación del estado triplete del dador como la del aceptor. Sin embargo, cuando se utilizan los iones lantánidos como aceptores de energía, el sistema está menos sujeto a la inhibición por colisiones del estado triplete del dador debidas al oxígeno [4], lo que es de gran interés desde un punto de vista práctico. Esta metodología es muy selectiva ya que sólo ciertos compuestos orgánicos pueden transferir su energía de forma eficaz al ión lantánido, obteniéndose un espectro de emisión característico. Otras ventajas adicionales de los iones lantánidos como reactivos analíticos son su buena estabilidad y, desde el punto de vista toxicológico, su carácter relativamente inocuo debido a su baja absorción en el tracto intestinal. Incluso, si

son inyectados, no pueden penetrar en las células vivas [5]. Por el contrario, muchos reactivos orgánicos utilizados con fines analíticos presentan una estabilidad limitada, lo que dificulta su almacenamiento y, frecuentemente, también presentan carácter tóxico.

Los iones terbio(III) y europio(III) han sido los más utilizados con fines analíticos [4,6], debido a sus niveles de energía y a los rendimientos cuánticos de sus quelatos. Estos iones forman complejos luminiscentes estables con ligandos bidentados o multidentados, especialmente cuando están implicados grupos dadores con átomos de oxígeno cargados negativamente. Aunque se han estudiado las propiedades espectrales de quelatos de lantánidos capaces de emitir a longitudes de onda mayores, como los de iterbio(III), neodimio(III) y erbio(III), su utilidad analítica hasta la fecha ha sido limitada. Este hecho puede atribuirse a que la luminiscencia de estos quelatos se ve afectada en mayor grado por el ambiente que los rodea. El distinto comportamiento observado para cada lantánido da una idea de la complejidad de la luminiscencia sensibilizada en la que están implicados varios niveles de energía del ligando y los estados excitado y fundamental de los distintos iones lantánidos.

A continuación se describen las características espectrales y temporales de los quelatos de iones lantánidos y los factores que afectan a la intensidad de su luminiscencia. También, se discuten sus aplicaciones analíticas más relevantes, que implican la determinación directa de especies orgánicas, su uso en métodos de inmunoensayo y en técnicas de separación, así como algunas aportaciones para la fabricación de sensores. Por último, se describe brevemente la utilidad de los lantánidos en métodos rápidos de selección, conocidos como “high throughput screening”, para el desarrollo de nuevos fármacos.

1. Características espectrales y temporales de los quelatos luminiscentes de iones lantánidos

Las transiciones electrónicas en los iones lantánidos se deben a los cambios en la capa electrónica 4f, que se encuentra parcialmente ocupada. Las transiciones debidas a la absorción dentro de esta capa están prohibidas y, por tanto, los coeficientes de absorción para los iones lantánidos son muy bajos debido a la baja fuerza oscilante de sus bandas de absorción. Esto da lugar a que la excitación directa de estos iones proporcione una señal luminiscente muy débil. Sin embargo, cuando se forman ciertos quelatos en los que el estado triplete del ligando excitado solapa con el nivel electrónico excitado del lantánido, se consigue una intensa

luminiscencia de éste último [7]. Por tanto, el proceso de transferencia es más eficaz que la absorción directa de radiación por el ión lantánido. La Figura 1 muestra un esquema de este proceso de transferencia de energía.

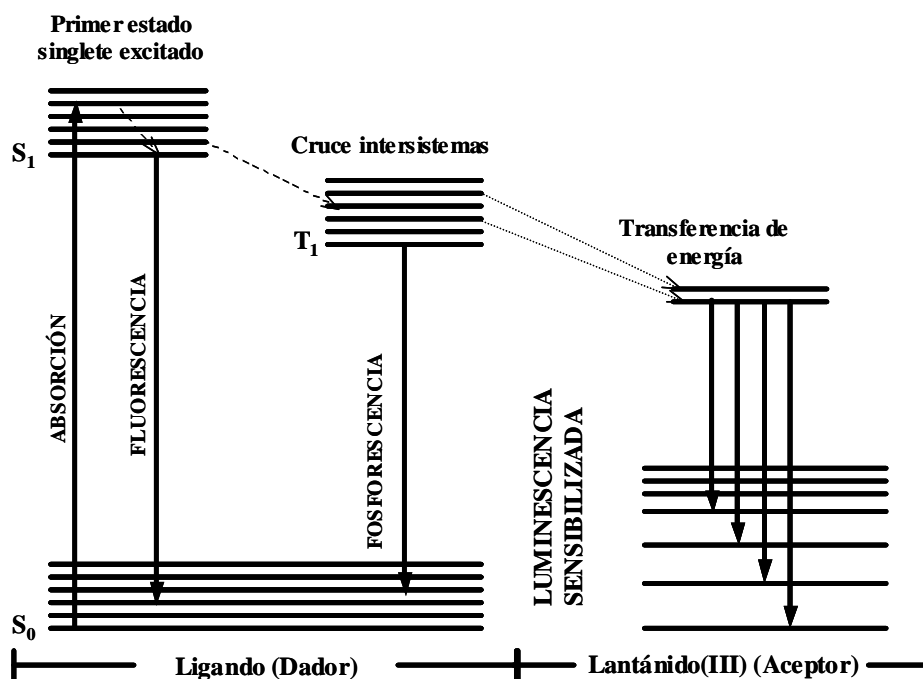


Figura 1. Mecanismo general del fenómeno de transferencia de energía intramolecular

El ligando orgánico absorbe energía, pasando al estado singlete excitado (S_1) y de ahí al estado triplete excitado (T_1) desde el que transfiere su energía al ión lantánido, el cual se excita y emite su radiación característica. El ión lantánido tiene dos funciones

Nuevas estrategias metodológicas mediante iones lantánidos aplicables al análisis de rutina

principales: favorece el paso del ligando al estado triplete excitado y actúa como aceptor de energía.

La utilización de reacciones luminiscentes que implican la formación de quelatos con iones lantánidos es una metodología analítica útil debido a sus características espectrales y temporales especiales:

- 1) Estos sistemas presentan una gran diferencia entre sus frecuencias de excitación y emisión (desplazamiento Stokes) y picos de emisión estrechos (de 1 a 20 nm de anchura a media altura), lo que permite obtener una baja señal de fondo debida a la muestra y minimizar el solapamiento espectral, favoreciendo la discriminación de la señal analítica. Las bandas de emisión características de los iones lantánidos utilizados en esta Memoria aparecen en la Tabla 1, en la que se destacan las más intensas:

Tabla 1. Bandas características de los iones lantánidos utilizados

Ion lantánido	Longitud de onda de emisión (nm)
Europio(III)	590, 615 , 650, 680
Terbio(III)	490, 545 , 585, 620
Iterbio(III)	980

2) Otra característica que presentan estos sistemas es que la vida media de su luminiscencia es relativamente larga, del orden de cientos de microsegundos, lo que permite la utilización de técnicas de tiempo resuelto. Para ello se usa una fuente de excitación pulsada junto con un sistema de detección que permite la integración de la señal luminiscente en un intervalo de tiempo dado, lo que les confiere una mayor selectividad. Las señales debidas a la dispersión, o cualquier señal de fondo fluorescente, pueden reducirse ya que su duración es menor, lo que permite la discriminación temporal de la señal analítica. La eliminación de estas señales reduce el ruido, lo que también contribuye a aumentar la sensibilidad. Además, la modalidad de tiempo resuelto mejora normalmente la señal analítica puesto que ésta se integra durante un tiempo más largo que en el modo fluorescencia. La Figura 2 muestra una curva típica de caída de la luminiscencia de estos quelatos de iones lantánidos, donde t_{esp} es el tiempo que se espera tras el pulso de la lámpara para comenzar la integración de la curva de caída, y t_{integ} es el intervalo de tiempo en el que se realiza la medida.

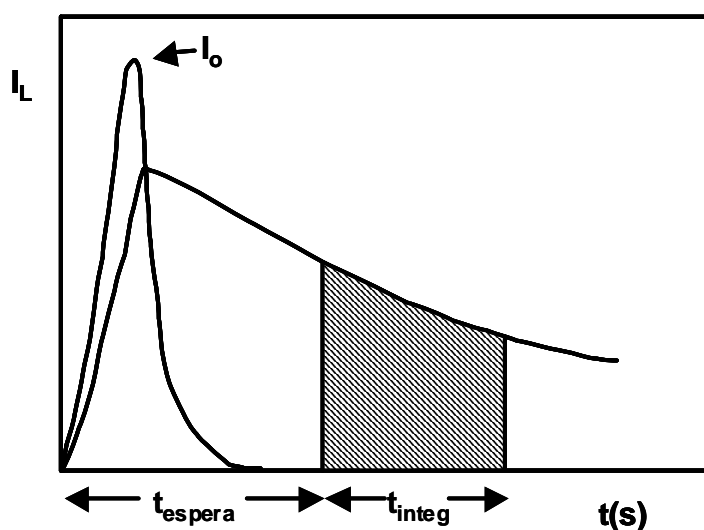


Figura 2. Curva característica de caída de la luminiscencia de los quelatos de iones lantánidos. I_0 : Intensidad máxima del pulso de radiación

La relativamente larga duración de la luminiscencia se debe a que las principales transiciones en quelatos muy luminiscentes (tales como ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$ y ${}^5D_4 \rightarrow {}^7F_4$ para los iones europio(III) y terbio(III)) son fuerzas de carácter dipolar [8]. La duración de los estados excitados son la suma de los tiempos de duración de la luminiscencia intrínseca del ión central y la suma de procesos de desactivación no radiantes, de acuerdo con la ecuación:

$$\tau = 1 / (k_r + k_{nr})$$

donde τ es la duración media de la luminiscencia, k_r es la constante de velocidad de la transición radiante del ión central y k_{nr} es la suma de las constantes de velocidad para todos los procesos de relajación no radiantes. Además, en quelatos luminiscentes de iones lantánidos, el estado triplete del ligando puede presentar una duración que oscila desde escasos nanosegundos hasta varios microsegundos, y la velocidad del cruce intrasistema desde el ligando al ión central puede influir en la duración de la luminiscencia observada [9].

En la práctica, la duración del estado excitado de los quelatos es también una función del rendimiento cuántico del ión central q_{LN} , el cual depende de las constantes de velocidad, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$q_{LN} = k_r / (k_r + k_{nr})$$

La existencia de moléculas de agua dentro de la esfera de coordinación del ión lantánido es la causa más común de relajación no radiante para todos los quelatos de lantánidos luminiscentes. La utilización de ligandos multidentados presenta una menor inhibición debida a las moléculas de agua ya que el lantánido queda más protegido, dando lugar a elevados rendimientos cuánticos y tiempos de duración de la luminiscencia más prolongados.

El mecanismo que explica la relativamente larga duración de la luminiscencia de los quelatos de terbio es más complejo que para otros lantánidos. Debido a que el salto energético existente entre el estado fundamental y el excitado de este lantánido es mayor que para otros lantánidos, este ión es menos sensible a las vibraciones O-H. Por otra parte, para los quelatos de terbio(III) existe una transferencia directa de energía del ligando al estado excitado 5D_4 del terbio, que es desde el que se produce la emisión de radiación. Esto implica que, si ambos niveles de energía están muy próximos, puede producirse inhibición de la luminiscencia sensibilizada debido a una inversión del flujo de energía [10]. Este mecanismo acorta la duración de la luminiscencia con ligandos que poseen estados triplete con energías cercanas al nivel 5D_4 . Asimismo, se ha encontrado que estos quelatos son sensibles al ambiente y se inhiben fuertemente cuando se conjugan a proteínas [11].

En varios quelatos de terbio(III) se ha encontrado, sin embargo, que la disminución de la duración de la luminiscencia no está directamente relacionada con la consiguiente disminución del rendimiento cuántico. Un ejemplo de este fenómeno lo constituyen los quelatos con β -dicetonas en disolución acuosa [12]. La sustitución gradual de hidrógeno por átomos de flúor desde 0 hasta 6 en la 2,4-pentanodiona no sólo aumentó la protonación del ligando,

permitiendo la utilización de valores bajos de pH, sino que también disminuyó la duración de la luminiscencia de los correspondientes quelatos de terbio. En ausencia de átomos de flúor, la duración de la luminiscencia fue de 390 ms, disminuyendo a 73 ms para el derivado trifluorado, y hasta 30 ms para el derivado hexafluorado. Por el contrario, la intensidad de la luminiscencia, aumentó hasta 30 veces después de la fluoración.

2. Factores que mejoran la intensidad de la señal luminiscente

Para que la transferencia de energía sea eficaz, se deben cumplir los siguientes requisitos: 1) las transiciones no radiantes ($S_1 \rightarrow S_0$ ó $T_1 \rightarrow S_0$) del ligando han de ser mínimas, 2) la energía del nivel de resonancia del ión lantánido debe ser ligeramente inferior a la del estado triplete excitado del ligando, de forma que la probabilidad de la transferencia de energía sea alta, y 3) no deben producirse transiciones no radiantes del ión lantánido excitado. Diversos factores, tales como agentes sinérgicos, tensoactivos, pH, co-luminiscencia y átomos pesados, contribuyen al cumplimiento de estos requisitos [6].

Los iones lantánidos, como ácidos fuertes que son, interaccionan preferentemente en disolución acuosa con bases fuertes como el

oxígeno, pero también pueden producirse interacciones con bases más débiles como las que contienen átomos de nitrógeno. Por tanto, estos iones pueden formar quelatos estables con ligandos que contengan grupos dadores cargados negativamente.

Los grupos dadores que contienen átomos de oxígeno o nitrógeno neutros generalmente se enlazan cuando forman parte de ligandos multidentados que contienen al menos 1 ó 2 grupos dadores con oxígeno cargados negativamente. Por ejemplo, teniendo en cuenta que el número de coordinación característico de los iones terbio(III) es nueve [13], el ácido dipicolínico (DPA) es un ligando tridentado eficaz para sensibilizar la luminiscencia de este ión, ya que el oxígeno no protonado de los grupos carboxilato es un dador fuerte y el nitrógeno del anillo piridínico es un dador débil [14]. Tres moléculas de DPA coordinan al ión lantánido saturando los nueve sitios de la esfera de coordinación. El resultado es un complejo soluble, poco susceptible a la inhibición debida al disolvente e intensamente luminiscente. Sin embargo, otros ligandos tales como las β -dicetonas, que normalmente dan lugar a complejos hexa- u octo- coordinados [15], dejan sitios de coordinación libres que pueden ser ocupados por el agua, lo que origina la inhibición de la luminiscencia debida a procesos de desactivación no radiantes. Este efecto negativo se puede evitar mediante un segundo ligando

que ejerce un efecto sinérgico por desplazamiento de las moléculas de agua de la esfera de coordinación del ión. Los aminopolicarboxilatos o el óxido de tri-n-octil fosfina (TOPO) se utilizan normalmente como agentes sinérgicos ya que tienen fuertes propiedades coordinantes y pueden llenar los huecos vacíos de la esfera de coordinación del ión metálico [16]. Debido a la presencia de un átomo de oxígeno y de tres cadenas de octilo dadoras en la molécula de TOPO, este compuesto protege, no sólo a los iones terbio(III) sino también al dador orgánico, de interferencias debidas a las colisiones. La eficacia de la sensibilización varía considerablemente con el pH, lo que se debe probablemente a los cambios en la formación del complejo y a la precipitación de los hidróxidos de terbio a valores altos de pH. En algunos casos, el ácido etilendiaminotetracético (AEDT) se ha utilizado para evitar la hidrólisis del terbio en medio alcalino, además de por su efecto sinérgico. Asimismo, la presencia de un tensoactivo en el sistema puede impedir la inhibición debida a las moléculas de agua y proteger al quelato de otros procesos de inhibición no radiantes.

La luminiscencia sensibilizada de terbio puede favorecerse en presencia de iones cesio ya que originan el efecto de átomo pesado, facilitando el paso del estado singlete al triplete del ligando [17,18]. Es conocido que los átomos pesados pueden aumentar el efecto de

acoplamiento espín-orbital y, por tanto, la probabilidad del cruce intersistemas. De los diferentes iones de átomos pesados (yoduro, bario, cesio y rubidio) utilizados con este fin, el cesio suele ser el más eficaz.

Otro fenómeno de interés analítico es el efecto de co-luminiscencia, que es el resultado de un gran aumento en la excitación del ión mediante la absorción de la radiación por quelatos de iones que no emiten luminiscencia, tales como Y(III) ó Gd(III) [19,20]. Este fenómeno implica la obtención de luminiscencia sensibilizada mediante transferencia de energía entre quelatos y su eficacia puede mejorarse notablemente utilizando un tensoactivo.

Un tipo especial de co-luminiscencia es la observada muy recientemente en algunos materiales compuestos por una matriz de cristal inorgánico dopada con iones lantánidos que emiten en el infrarrojo [21-24] . Estos cristales son capaces de convertir radiación infrarroja en visible mediante la absorción de fotones con energías en el infrarrojo [25]. Así, se da el fenómeno de luminiscencia anti-Stokes, denominado “up-conversion”, en la que debido a que los lantánidos trivalentes tienen estados excitados de larga duración, se consigue el paso a un estado excitado metaestable desde un estado fundamental. A partir de aquí puede excitarse otra vez a un estado desde el que emite (o transfiere su energía a otro ión). En la Figura 3

se muestra el diagrama de energías correspondiente a un cristal dopado con Yb(III) y Er(III).

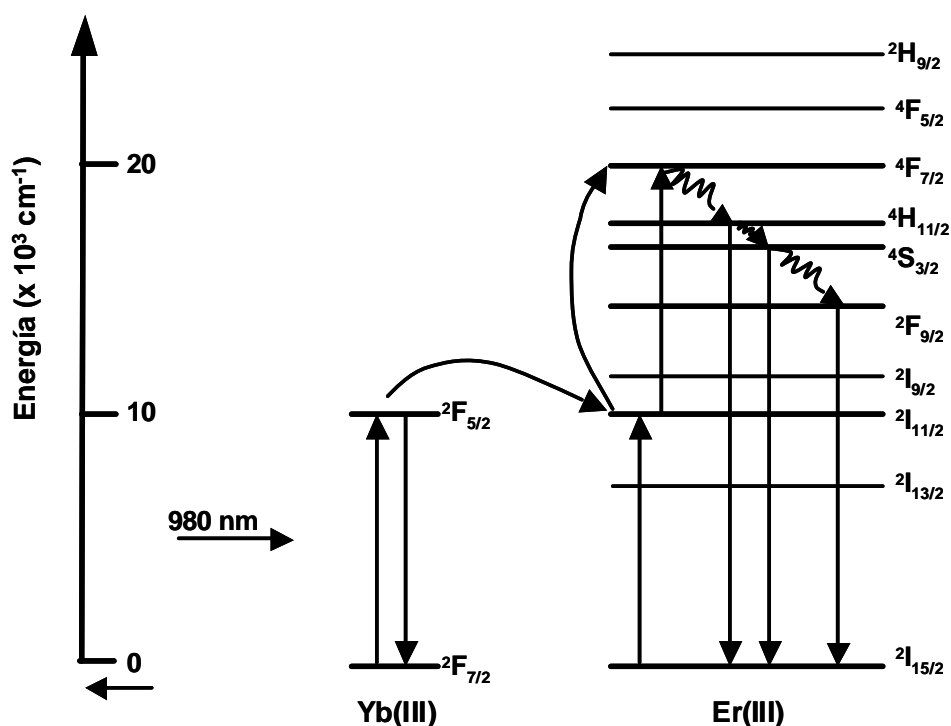


Figura 3. Diagrama de niveles de energía del proceso de “up-conversion” basado en transferencia de energía en un cristal dopado con iterbio y erbio

Los iones Yb(III) absorben energía y se excitan por la incidencia de radiación infrarroja (transición ${}^2F_{7/2} \rightarrow {}^2F_{5/2}$),

transfiriendo su energía de forma no radiante a los iones Er(III) para primero excitar a éstos desde un estado fundamental ($^4I_{15/2}$) a un estado metaestable ($^4I_{11/2}$), y después a un estado excitado ($^4F_{7/2}$). El estado excitado se relaja a múltiples estados de emisión, principalmente a través de procesos no radiantes, y las bandas de emisión en el rojo y en el verde se asignan a transiciones radiantes ($^2H_{11/2} \rightarrow ^4I_{15/2}$, $^4S_{3/2} \rightarrow ^4I_{15/2}$ y $^4F_{9/2} \rightarrow ^4I_{15/2}$).

De esta forma, la fotoluminiscencia anti-Stokes puede medirse libre de autofluorescencia y de radiación incidente dispersada. En principio, la señal de fondo de la luminiscencia anti-Stokes es equivalente a la conseguida con la luminiscencia de tiempo resuelto, donde la corriente oscura del detector establece el límite de detección instrumental. Asimismo, estos cristales de iones lantánidos poseen las características asociadas a la fotoluminiscencia de estos iones como bandas de emisión estrechas y un gran desplazamiento anti-Stokes. La principal ventaja de esta metodología es que se podrían obtener bajos límites de detección sin utilizar medidas con resolución temporal, sino con un detector convencional sencillo. Un láser de diodos en el infrarrojo sirve como fuente de excitación y los dispositivos adecuados para la selección de longitudes de onda en esta zona del espectro son los otros componentes de la instrumentación necesaria [26].

3. Aplicaciones analíticas

3.1. Determinación directa de compuestos orgánicos

Las características especiales de los quelatos de iones lantánidos se han aplicado extensamente a la determinación de analitos orgánicos mediante luminiscencia sensibilizada, a pesar de que sólo un grupo relativamente limitado de compuestos reúne los requisitos espectrales y complejantes anteriormente descritos. Como ya se ha indicado, el nivel del estado triplete más bajo del ligando debe estar justo por encima del nivel de resonancia del ión lantánido, ya que la eficacia del proceso de transferencia de energía depende de la coincidencia de los niveles de energía del analito y del lantánido. Este requisito proporciona una gran selectividad a los métodos basados en luminiscencia sensibilizada de lantánidos ya que sólo ciertos grupos funcionales tienen energías del estado triplete próximas a las del estado excitado del lantánido. Los iones terbio(III) se han utilizado de forma más extensa que los iones europio(III) para la determinación directa de analitos orgánicos, lo que puede deberse, entre otros factores, a una mayor coincidencia del estado triplete de los ligandos y los niveles de resonancia de estos iones. La mayoría de los métodos propuestos pueden

aplicarse directamente al análisis de las muestras, necesitando a veces sólo una sencilla etapa de pretratamiento. A pesar de las ventajas ofrecidas por la metodología de tiempo resuelto, ésta se ha aplicado solamente en algunas determinaciones [27-36]. Asimismo, se puede obtener una mejora en la selectividad utilizando medidas de la velocidad inicial del sistema como parámetro analítico en lugar de las medidas en el equilibrio [29, 32, 33, 37]. Algunos de estos aspectos se discutirán más adelante.

Un grupo de compuestos que reúne los requisitos implicados en la luminiscencia sensibilizada de lantánidos son el ácido benzoico y algunos derivados, tales como los ácidos orto- y parahidroxibenzoico, orto- y para-aminobenzoico, para-aminosalicílico y 5-fluoro-salicílico y diflunisal. Todos ellos forman quelatos muy luminiscentes con terbio, dependiendo la intensidad obtenida del pH, la posición del sustituyente del anillo aromático que contiene el grupo ácido carboxílico y el número de grupos dadores disponibles para la complejación, aspectos que han sido ampliamente discutidos [38-41]. Las características de los métodos descritos para la determinación de algunos de estos compuestos se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Características de los métodos descritos para la determinación de ácido benzoico y derivados mediante luminiscencia sensibilizada de terbio

Analito	Modo F/TR	Método	LD ng ml ⁻¹	Muestra	Tratamiento de la muestra	Referencia
Ácido benzoico	TR	E	40	Refrescos	Desgasificado	30
	TR	C	70	Refrescos	Desgasificado	30
Ácido salicílico	F	E	1200	Suero, orina	Ninguno	42
	TR	E	2	Suero	Ninguno	27
	TR	C	7	Suero	Ninguno	27
Ácido p-aminobenzoico	F	E	9.6	Suero, orina	Hidrólisis alcalina	39
	TR	C	20	fármacos	Ninguno	28
Ácido p-aminosalicílico	F	E	3.1	Suero, orina	Hidrólisis alcalina	39
Diflunisal	F	E	2.4	Suero, orina	Ninguno	43
	F	E	900	Suero, orina	Ninguno	42
	TR	E	3	Suero	Ninguno	27
	TR	C	6	Suero	Ninguno	27

F- fluorescencia; TR- tiempo resuelto; E- método en el equilibrio; C- método cinético; LD- límite de detección

Como puede observarse, el límite de detección para ácido salicílico es inferior al descrito para ácido benzoico. Esto puede atribuirse a que tanto los grupos fenol como carboxilato están implicados en la formación del quelato de salicilato, originando un complejo más luminiscente que el de benzoato, en el que el grupo carboxilato es el único implicado en la complejación. Se ha descrito

un método cinético simultáneo para la determinación de ácido benzoico y sacarina en bebidas refrescantes [30] mediante medidas de velocidad inicial y en el equilibrio, obtenidas para los correspondientes quelatos luminiscentes de terbio. También se han propuesto dos métodos para la determinación simultánea de ácido salicílico y diflunisal mediante medidas fluorimétricas [42], que implican la utilización de la segunda derivada del espectro sincrónico, y medidas de tiempo resuelto mediante cinética diferencial [27]. En ninguno de estos métodos se requirió el tratamiento previo de la muestra de suero, pero los límites de detección obtenidos fueron mucho más bajos en el segundo caso. También se ha descrito un método más sensible para la determinación individual de diflunisal [43], utilizando medidas fluorimétricas, pero el ácido salicílico interfiere en la determinación.

La luminiscencia sensibilizada de lantánidos se ha aplicado extensamente a la determinación de nucleótidos [44, 45] y ácidos nucleicos [19, 46]. Los primeros métodos propuestos se han discutido previamente [6]. Algunos de los más recientes se basan en la inhibición de la luminiscencia del quelato terbio(III)-tirón [45, 46] y en sistemas en los que se utiliza el fenómeno de co-luminiscencia [19]. Se ha descrito también ampliamente la utilidad de la luminiscencia sensibilizada de lantánidos para los ensayos de

hibridación de ácidos nucleicos [47-51]. Estos ensayos se basan en la capacidad de los fragmentos de ADN y ARN marcados para detectar secuencias complementarias de nucleótidos. Una metodología utilizada con este fin es la luminiscencia de lantánidos amplificada por enzimas (EALL) [47], en la que el sustrato de una enzima utilizada como marcador, que en las condiciones de medida no forma un quelato luminiscente con el ión terbio(III), se convierte en un producto que sí forma el quelato. Mientras que la enzima amplifica la señal analítica, la luminiscencia sensibilizada de terbio(III) permite la disminución de la señal de fondo. Esta metodología se ha desarrollado utilizando fosfatasa alcalina (ALP) como marcador y el éster fosfato del ácido 5-fluorosalicílico como sustrato [47,49]. La ruptura enzimática del grupo fosfato produce fluorosalicilato, el cual forma un complejo ternario de larga duración de la luminiscencia con terbio y AEDT. Se ha descrito un ensayo en el que se utilizan dos etapas sucesivas de amplificación enzimática, que implican el uso de ALP y peroxidasa, con medidas de tiempo resuelto para mejorar la sensibilidad [50].

Una aplicación interesante de la luminiscencia sensibilizada de lantánidos es la determinación sensible y selectiva de esporas bacterianas [36, 52-54], basada en que éstas contienen el anión dipicolinato como constituyente, el cual forma un quelato estable e intensamente luminiscente con iones terbio(III) [14]. Los iones

europio(III) se ensayaron también con este fin, pero los iones terbio(III) proporcionaron una señal luminiscente más intensa. Se han descrito otros métodos para la determinación de proteínas y péptidos [6, 35], fármacos antiinflamatorios no esteroideos [34, 55, 56], como furosemida, y los ácidos mefenámico, tolfenámico y tiaprofénico. Otros analitos determinados mediante esta metodología han sido el ácido orótico [57], un precursor en la biosíntesis de pirimidina, y antibióticos tales como lasalocid [58], ampicilina [59] y ácido pipemidínico [60], y barbaloina [61], un componente del aloe vera. El raticida difacinona se determinó utilizando Eu(III) como reactivo [62], usando este sistema también como base para la determinación de ácido carmínico por inhibición de la luminiscencia sensibilizada [63]. El fenómeno de inhibición se ha utilizado también para la determinación de iones metálicos como Cu(II) a niveles de ng ml^{-1} [64].

La aplicación de la metodología cinética en luminiscencia sensibilizada de lantánidos ha dado lugar a la obtención de límites de detección similares a los obtenidos mediante medidas en el equilibrio. Sin embargo, los métodos dinámicos que implican medidas de velocidad inicial pueden mejorar la selectividad ya que no interfieren las señales de fondo estáticas procedentes de la matriz de la muestra. Este efecto positivo se ha puesto de manifiesto

en diversos métodos para determinar bromadiolona [32], antranilato de metilo [33] y galato de propilo [37]. Las curvas cinéticas obtenidas para el sistema terbio(III)-galato de propilo en presencia de otros derivados galato, se muestran en la Figura 4.

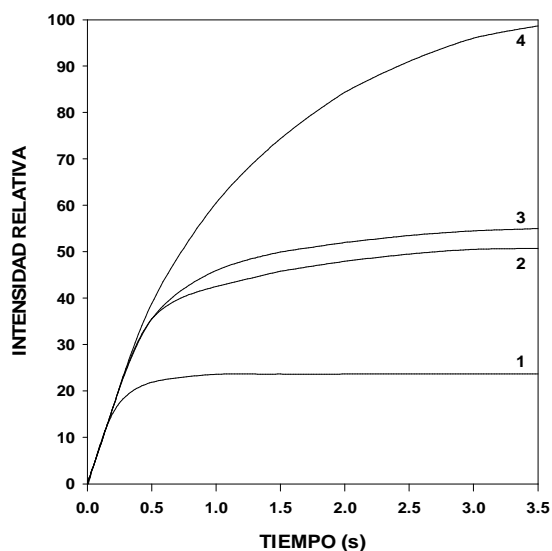


Figura 4. Curvas cinéticas obtenidas para galato de propilo ($1 \mu\text{g ml}^{-1}$) sólo (1) y en presencia de galato de octilo ($20 \mu\text{g ml}^{-1}$) (2), galato de dodecilo ($10 \mu\text{g ml}^{-1}$) (3) y ácido gálico ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) (4)

En ella puede observarse que la señal obtenida en el equilibrio se modifica por dichos compuestos, mientras que la pendiente inicial de las curvas permanece inalterada. Asimismo, se estudió el sistema terbio(III)-ácido tereftálico en el modo de tiempo resuelto y se obtuvieron medidas cinéticas y en el equilibrio para comparar las características de los métodos correspondientes [29]. Los valores de

recuperación obtenidos al aplicar ambos métodos al análisis directo de muestras de bebidas fueron mejores utilizando la metodología cinética. La elevada velocidad inicial de los sistemas basados en luminiscencia sensibilizada de lantánidos puede medirse fácilmente mediante la técnica de mezcla de flujo detenido, lo que facilita también la automatización parcial de los métodos y su aplicación al análisis de rutina. Esta técnica se ha utilizado junto con un espectrómetro de luminiscencia con configuración en T para la determinación simultánea de dos antioxidantes, galato de propilo y butilhidroxianisol (BHA), en muestras de alimentos [65]. El método implica dos reacciones distintas e independientes: la formación del complejo terbio-galato de propilo y la reacción de BHA con la forma oxidada del azul nilo. La ausencia de solapamiento en los espectros de emisión de ambos sistemas posibilitó la medida de los analitos de forma separada en cada canal del instrumento.

3.2. Métodos de inmunoensayo

3.2.1. Métodos basados en el uso de lantánidos como marcadores

Los marcadores que implican quelatos de terbio han sido ampliamente utilizados en varios formatos de inmunoensayo como una alternativa válida a los fluoróforos convencionales. Una de las ventajas más destacables de esta metodología es que las señales

de fondo fluorescentes de las muestras biológicas pueden minimizarse. Un quelato lantánido ideal utilizado con este fin debería tener una constante de estabilidad muy alta, ser soluble en agua, tener un espectro de excitación con una elevada absorbancia, transferir eficazmente la energía desde el ligando al ión central, y contener un grupo funcional adecuado para unirse de forma covalente a uno de los inmunoreactivos [66]. Sin embargo, es muy difícil combinar todos esos requisitos en la misma estructura molecular ya que, normalmente, la luminiscencia de los quelatos estables es baja en disoluciones muy diluidas, mientras que los quelatos muy luminiscentes se disocian fácilmente al diluir la disolución.

Los quelatos de terbio(III)-poliaminocarboxilato se han utilizado en inmunoensayo porque presentan una gran estabilidad y solubilidad, pero las complexonas no presentan por sí solas la absorción necesaria para la que se produzca la excitación sensibilizada del ión complejado. Sin embargo, se han ensayado dos metodologías para superar esta limitación:

- 1) El marcador de terbio se obtiene mediante la preparación de un reactivo quelatante bifuncional, que origina un quelato estable y luminiscente. De esta forma, se ha descrito un marcador basado en el derivado 4-aminosalicilato del ácido

dietilentriaminopentaacético (DTPA) para la determinación de albúmina, inmunoglobulina G y testosterona [67]. Se han caracterizado los conjugados de los derivados 4-isotiocianatobencilo del ácido nitriloacético, AEDT y DTPA con terbio y anticuerpos monoclonales frente al antígeno carcinoembrionario mediante tiempo resuelto [68]. Asimismo, se han descrito como marcadores adecuados los quelatos de terbio de derivados carboxilato de quinolonas [69] y derivados di- y tetracarboxilato de piridinas, bipyridinas y terpiridinas [70].

- 2) Se adiciona una disolución, denominada amplificadora, después de la reacción inmunoquímica, la cual permite la disociación del lantánido del marcador y la formación de un nuevo quelato luminiscente. Por ejemplo, se ha descrito un inmunoensayo de tiempo resuelto [71] en el que el quelato terbio(III)-DTPA se utiliza para obtener el marcador y el ácido oxolínico se propone como sensibilizador de la luminiscencia de los iones terbio(III). Otro ejemplo es un inmunoensayo homogéneo para determinar escatol en muestras de grasa animal [72], que utiliza Eu(III) como marcador. La metodología cinética permitió obtener medidas de velocidad inicial de disociación del Eu(III) del trazador, que es diferente dependiendo si el trazador está libre o enlazado al anticuerpo. Este comportamiento permitió el desarrollo del inmunoensayo

sin necesidad de la separación física de las fases libre y enlazada del marcador.

Más interesante es el uso de dos o más marcadores diferentes en inmunoensayos múltiples para detectar varios analitos simultáneamente, basándose en que cada ión lantánido presenta propiedades luminiscentes a longitudes de onda diferentes. Se han descrito determinaciones simultáneas de nortestosterona y dietilestilbestrol [73], de las fracciones libre y total del antígeno específico de la próstata (PSA) [74, 75], y lutotropina y folitropina [20], utilizando quelatos de terbio y europio como marcadores (Figura 5). Se han medido cuatro analitos diferentes (creatina quinasa, 17 α -hidroxi-progesterona, tripsina inmunorreactiva y la hormona tiroidea estimulada) en un único ensayo que implica el uso de marcadores que contienen terbio, europio, samario y disprosio [76].

Estos métodos se basan en inmunoensayos heterogéneos en los que los inmunorreactivos adecuados se inmovilizan sobre bolitas, microplacas o tiras para facilitar las etapas de separación. Se ha descrito un inmunoensayo con dos marcadores utilizando dos anticuerpos monoclonales frente a dos epítomos diferentes de la subunidad β de la gonadotropina coriónica humana, uno de ellos marcado con un quelato de terbio dador de energía y el otro con un

aceptor, tetrametilrodamina [77]. Se ha descrito también el efecto positivo del proceso de co-luminiscencia en el inmunoensayo, incluyendo determinaciones simultáneas [78].

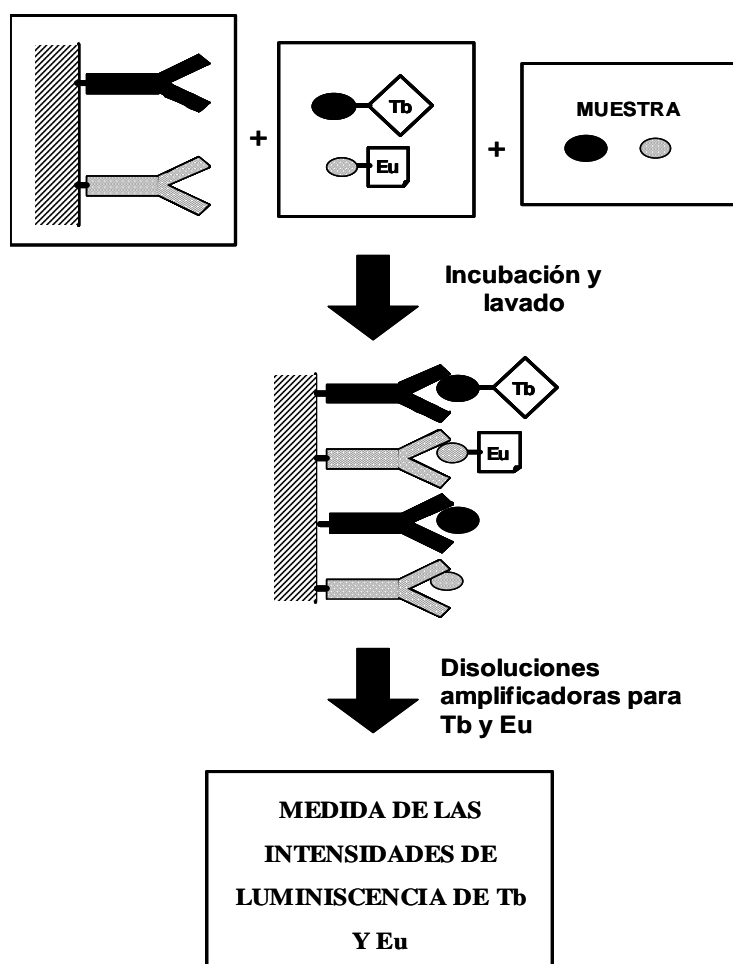


Figura 5. Esquema de un inmunoensayo dual que implica la utilización de marcadores basados en quelatos de terbio y europio

Una metodología relativamente reciente se basa en el uso de nanopartículas que incorporan quelatos de iones lantánidos en su estructura. Actualmente existen partículas comercialmente disponibles que contienen complejos de Eu(III) con beta-dicetonas, los cuales están recubiertos por una capa de poliestireno. Estas partículas presentan propiedades espectroscópicas similares a los complejos libres en disolución. Se han descrito algunas aplicaciones orientadas a la determinación del PSA [79-85] mediante medidas en superficie sólida y en el modo de tiempo resuelto. En estas determinaciones se utilizaron nanopartículas comerciales con un diámetro promedio de 107 nm y tris (naftoiltrifluorobutadiona) como ligando para el Eu(III) [79]. El ensayo se realizó en microplacas anti-PSA a las que se añadió PSA enlazado a biotina y, después de las etapas de incubación y lavado, se añadió la nanopartícula enlazada a estreptavidina. Tras diversos ensayos de optimización y estudios sobre la probabilidad de uniones no específicas y sobre constantes de afinidad, este método se aplicó a la determinación de PSA en muestras de suero [84]. Se ha descrito más recientemente el uso de estas nanopartículas como marcador en inmunoensayos competitivos homogéneos de proximidad para la determinación de estradiol [86]. En estos inmunoensayos, las partículas se recubrieron con fragmentos de anticuerpos recombinantes frente al estradiol y se adicionaron a los pocillos junto al estradiol. A continuación se añadió

el estradiol marcado con Alexa 680, que es un fluoróforo de larga longitud de onda cuyo espectro de excitación solapa con el de emisión del Eu(III). De esta forma, este último conjugado se une a los sitios activos del anticuerpo y se puede observar la emisión del Alexa 680 debido a un proceso de transferencia de energía desde el complejo de europio. El límite de detección obtenido para estradiol fue 70 pmol l^{-1} .

3.2.2. Métodos basados en luminiscencia de lantánidos amplificada por enzimas (EALL)

La aplicación de EALL en inmunoensayo [47] abrió nuevas perspectivas bastante ventajosas mediante la utilización de complejos de lantánidos, especialmente los de iones terbio. Esta metodología consiste básicamente en la utilización de enzimas como marcadores, las cuales permiten la generación de ligandos capaces de transferir energía al ión lantánido, a diferencia de los sustratos de partida. Esta herramienta combina la amplificación enzimática de los métodos ELISA con la elevada sensibilidad que proporciona la luminiscencia sensibilizada de lantánidos. La única enzima utilizada para el marcaje en este tipo de inmunoensayo ha sido la ALP. Se han ensayado numerosos ligandos orgánicos de terbio como sustratos de esta enzima [38, 87], aunque tan sólo tres compuestos, fosfato de salicilo [88], fosfato de fluorosalicilo [47, 89, 90] y fosfato

de diflunisal [38, 91-96], se han utilizado con este fin. Estos compuestos no pueden coordinarse eficazmente con el complejo terbio(III)-AEDT, pero el complejo luminiscente se forma en presencia de ALP, ya que descompone el éster fosfato y libera el ligando. Se han descrito algunos métodos para la determinación de α -fetoproteína en suero utilizando los tres sustratos, obteniendo límites de detección muy similares: 5 [38], 2 [88] y 1 pg ml^{-1} [90]. Estos valores relativamente bajos indican la elevada sensibilidad de esta metodología, la cual también se ha aplicado a la determinación de tirotrópina [89], PSA [91, 92], prostaglandina-D sintetasa [93], creatina quinasa BB [94], factor α de la necrosis tumoral [95] e interleucina 6 [96].

Se han evaluado diversos sustratos fenólicos de la peroxidasa para EALL [18]. Estos compuestos se dimerizan en el transcurso de la reacción enzimática y, posteriormente, forman complejos luminiscentes ternarios con terbio y AEDT en medio alcalino. Se puede conseguir un límite de detección muy bajo para la peroxidasa, $2 \times 10^{-12} \text{ mol l}^{-1}$, por lo que podría aplicarse en inmunoensayo. Para que los iones terbio no precipiten a valores altos de pH es necesario añadir AEDT como complejante, el cual origina una pequeña señal de fondo que limita la sensibilidad de estos ensayos. Para paliar este inconveniente, se han descrito recientemente algunos métodos en los que la reacción de formación del complejo se realiza a pH neutro

[97,98]. Los ligandos utilizados fueron el éster acetato del ácido bis(2-piridilmetil)-2-hidroxibencilamino carboxílico [97] y el 2,6-piridíndicarboxialdehído [98], que funcionan como sustratos de las esterasas. En la determinación de xantinas oxidasas se utilizó como sustrato el 2,6-piridíndicarboxialdehído, que libera el ácido 2,6-piridíndicarboxílico cuando se oxida en presencia de la enzima [98].

3.3. Técnicas de separación

La utilización de iones lantánidos como derivatizantes en cromatografía líquida se discutirá en la introducción del capítulo II. Este apartado se centrará en la descripción de las principales aplicaciones analíticas de la luminiscencia sensibilizada de lantánidos combinadas con electroforesis, las cuales son relativamente escasas.

El terbio(III) se ha utilizado como reactivo derivatizante en electroforesis de geles de poliacrilamida para la determinación de proteínas [99] y ácidos nucleicos [100]. Las proteínas se derivatizaron tras la etapa de separación, pero los ácidos nucleicos se detectaron en línea mediante la preparación de sus correspondientes conjugados con un quelato luminiscente formado con terbio(III), DTPA y p-aminosalicilato. Los conjugados fueron muy

estables y su luminiscencia fue también estable a altas diluciones y durante el proceso electroforético. Se utilizó el modo de tiempo resuelto para eliminar las señales fluorescentes de fondo.

La electroforesis capilar con adición de terbio post-columna se ha utilizado para la determinación de diflunisal y ácido salicílico [101] y catecolaminas y compuestos afines [17]. La Figura 6 muestra un esquema del sistema de reacción post-columna utilizado para este último método, que se aplicó a la cuantificación de dopamina, epinefrina, norepinefrina, 3,4-dihidroxifenilglicol, dopa y ácido 3,4-dihidroxifenilacético en orina. El depósito de reactivo contiene 1-2 ml de disolución y los capilares de separación y reacción se conectan mediante un tubo poroso dejando sólo un estrecho hueco entre ellos. La disolución de reactivo se introduce a través del tubo poroso en el capilar de reacción mediante presión, suministrada y controlada por el sistema de inyección del instrumento. Además del terbio, el reactivo derivatizante contenía AEDT y cesio para mejorar la señal luminiscente. Asimismo, se han descrito métodos con adición de terbio pre-columna para la determinación de ácido salicílico y sus metabolitos en suero y orina [102] y de diversas complexonas [103].

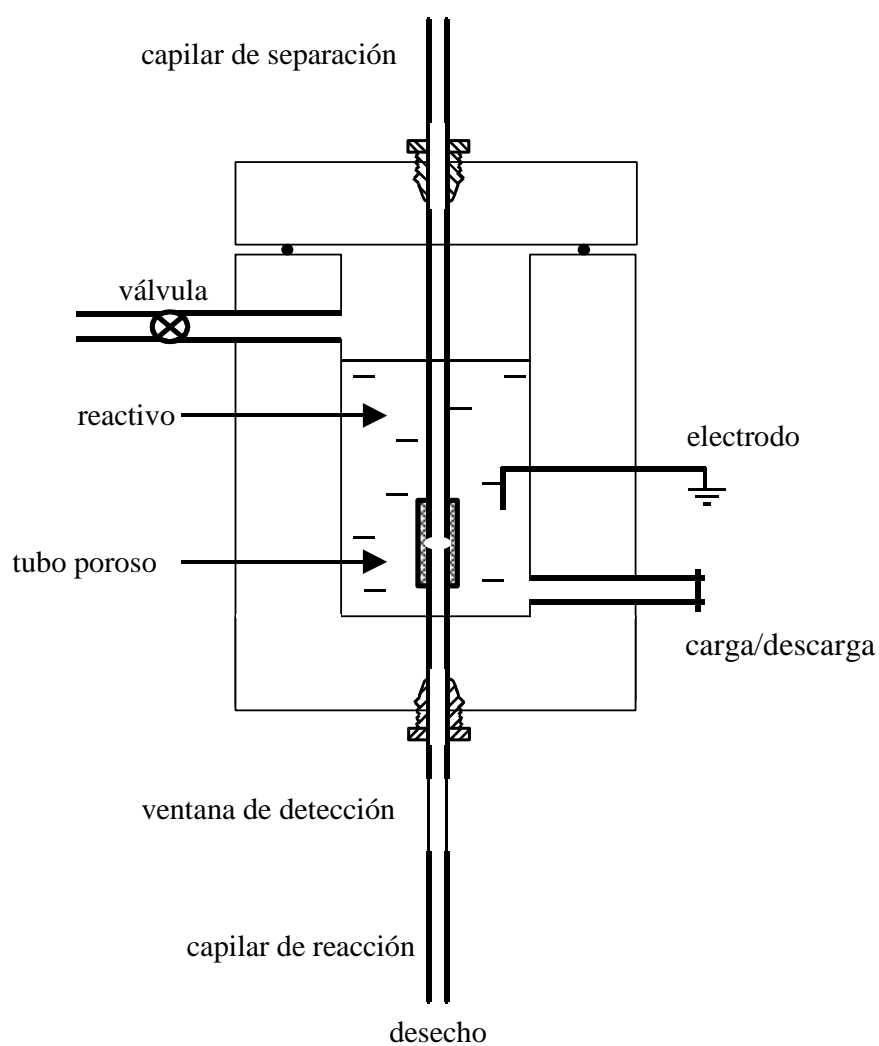


Figura 6. Diseño del reactor post-columna para electroforesis capilar

Se han determinado mediante cromatografía electrocinética micelar (MEKC) algunas hormonas esteroideas (progesterona y testosterona) [104] y ácido orótico [105], adicionando iones terbio(III) a la disolución reguladora electrolito. El límite de detección obtenido para el ácido orótico fue más de 100 veces menor que el obtenido mediante absorción UV bajo las mismas condiciones experimentales.

3.4. Sensores

La luminiscencia sensibilizada de lantánidos también se ha utilizado para el desarrollo de sistemas sensores. Recientemente, se han propuesto diversos dispositivos luminiscentes para la fabricación de sistemas sensores para cationes y aniones de interés biológico y farmacéutico [106]. Existen principalmente dos estrategias para el diseño de la fase sensora basada en quelatos lantánidos. La primera consiste en el uso de estructuras previamente organizadas que encapsulan el lantánido en moléculas criptando o hemicriptando en las que el metal se inserta en el hueco confinado [107]. La segunda opción utiliza grupos funcionales aniónicos insertados en compuestos heterocíclicos aromáticos que estabilizan los complejos resultantes a través de múltiples interacciones electrostáticas con los iones lantánidos [108]. Éstos son grupos dadores negativamente

cargados por los que el lantánido presenta una fuerte afinidad. Se pretende obtener, a diferencia de la síntesis de marcadores, quelatos de iones con la esfera de coordinación parcialmente desocupada para conseguir la detección de los aniones, que pasan a formar parte de la misma [109]. Esta inclusión en la esfera de coordinación se consigue debido a que las especies desplazadas son las moléculas del disolvente, que están débilmente coordinadas al metal. No obstante, estos dispositivos luminiscentes no han tenido hasta la fecha una aplicación práctica en el análisis de muestras reales.

Se ha desarrollado otro tipo de sensores para la determinación del cinc libre en muestras biológicas utilizando Eu(III) y un ligando con grupos quinolilo en su estructura [110]. Este ligando reacciona de forma bastante selectiva en presencia de cinc, aumentando su intensidad de fluorescencia y, por tanto, la luminiscencia sensibilizada de los iones europio. La tecnología sol-gel se ha utilizado para el desarrollo de sensores de pH incorporando para ello quelatos de terbio y europio [111] dentro de la matriz sol-gel.

Se han descrito diversos sistemas sensores en flujo ("flow-through sensors") basados en la inmovilización transitoria de los quelatos luminiscentes en resinas de distinta naturaleza, principalmente no iónica o catiónica de ácido débil. Se ha abordado

la determinación de diversos antibióticos como tetraciclinas [112], antraciclinas [113] y algunas quinolonas, como ciprofloxacina [114], norfloxacina [115] y ácido pipemídico [116]. Uno de estos sensores se regeneró con ayuda de agentes desplazantes, como por ejemplo AEDT, por lo que el quelato resultante fue negativo, no quedando por esta razón retenido en la resina catiónica [116].

3.5. Métodos rápidos de selección (high throughput screening) para el desarrollo de nuevos fármacos

Un ámbito en el que la utilización de ensayos de afinidad homogéneos tiene un especial interés es en el proceso de desarrollo de nuevos fármacos mediante métodos rápidos de selección, denominados “high-throughput screening” (HTS). Con este fin, se utilizan diversas técnicas luminiscentes entre las que se encuentran las basadas en transferencia de energía. Entre otras, se utiliza el fluorinmunoensayo de tiempo resuelto (TR-FIA) y el fluorinmunoensayo de tiempo resuelto mediante transferencia de energía por resonancia (TR-FRET) [117], en el que quelatos de iones lantánidos actúan comúnmente como dadores. La elevada sensibilidad de estas técnicas y su capacidad para realizar ensayos en medio homogéneo, ha dado lugar a la disponibilidad de instrumentos comerciales en los que se conjugan tres factores

básicos que son automatización, robótica y miniaturización. Esta instrumentación se basa generalmente en la utilización de microplacas que pueden llegar a contener hasta 3456 pocillos. TR-FRET se ha utilizado en ensayos para el estudio de las interacciones receptor-ligando [118,119] o para la determinación de diversas especies implicadas en los mecanismos de señalización celular como el trifosfato de guanosina (GTP) [120] y las quinasas [121,122]. Otras enzimas, como por ejemplo, las proteasas, son un grupo importante para la aplicación de estas técnicas. Se han diseñado ensayos basados en TR-FRET para determinar caspasas [123], telomerasas [124] y helicasas [125,126] entre otras.

Con objeto de reducir costes y acelerar el proceso de desarrollo de nuevos fármacos, actualmente se está tendiendo a utilizar los métodos HTS en estudios de absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad, denominados ADMET, realizando estos estudios en presencia de células. Los ensayos de citotoxicidad, que utilizan de forma tradicional el ensayo con cromo radiactivo, están siendo reemplazados por otras alternativas menos peligrosas, como la liberación de europio [127] o de ligandos fluorogénicos [128]. En cuanto a estudios de distribución y acumulación, se ha utilizado albúmina marcada con europio [129] para conocer el transporte del fármaco hasta el cerebro a través del flujo sanguíneo para el tratamiento de la meningitis.

REFERENCIAS

1. E.P. Diamandis, *Clin. Biochem.* 21 (1988) 139.
2. M. Amin, K. Harrington, R. Von Wandruska, *Anal. Chem.* 65 (1993) 2346.
3. A.G. Mwalupindi, I.M. Warner, *Anal. Chim. Acta* 306 (1995) 49.
4. C.H. Evans, "Biochemistry of the lanthanides" Plenum Press, New York 1990, pp. 339-377.
5. J. Georges, *Analyst* 118 (1993) 1481.
6. A. Rieutord, P. Prognon, F. Brion, G. Mahuzier, *Analyst* 122 (1997) 59R.
7. E. Soini, T. Lövgren, *CRC Crit. Rev. Anal. Chem.* 18 (1987) 105.
8. J.C. Bünzli, G.R. Chopin, *Lanthanide Probes in Life, Chemical and Earth Sciences. Theory and Practice*, Elsevier, Amsterdam, New York, 1989.
9. I. Hemmilä, V. Laitala, *J. Fluorescence* 15 (2005) 529.
10. N. Sabbatini, M. Guardigli. *Coord. Chem. Rev.* 123 (1993) 201.
11. I. Hemmilä, V.M. Mikkala, H. Takalo. *J. Alloys Compounds* 249 (2005) 158.
12. I. Hemmilä, *Anal. Chem.* 57 (1985) 1676.
13. J.E. Huheey, E.A. Keiter, R. Keiter, *Inorganic Chemistry*, Harper Collins, New York, 1993, pp.609.
14. N. Arnaud, E. Vaquer, J. Georges, *Analyst* 123 (1998) 261.

15. A.L. Jenkins, G.M. Murray, *Anal. Chem.* 68 (1996) 2974.
16. M. Morin, R. Bador, H. Dechaud, *Anal. Chim. Acta* 219 (1989) 67.
17. R. Zhu, W.T. Kok, *Anal. Chem.* 69 (1997) 4010.
18. J. Meyer, U. Karst, *Analyst* 125 (2000) 1537.
19. C.G. Lin, J.H. Yang, X. Wu, G.L. Zhang, R.T. Liu, X.H. Cao, R.J. Han, *Anal. Chim. Acta* 403 (2000) 219.
20. Y.Y. Xu, I.A. Hemmilä, *Anal. Chim. Acta* 256 (1992) 9.
21. H. Sun, C. Yu, G. Zhou, Z. Duan, M. Liao, J. Zhang, L. Hu, Z. Jiang, *Spectrochim. Acta A* 62 (2005) 1000.
22. H. Sun, L. Zhang, J. Zhang, C. Yu, Z. Duan, , L. Hu, Z. Jiang, *J. Non-Crystal. Solids* 351 (2005) 2361.
23. A.S. Gouveia-Neto, E.B. Da Costa, L.A. Bueno, S.J.L. Ribeiro, *Opt. Mat.* 26 (2004) 271.
24. R.H. Page, K.I. Schaffers, P.A. Waide, J.B. Tassano, S.A. Payne, W.F. Krupke, W.K. Bischel, *J. Opt. Soc. Am. B* 15 (1998) 996.
25. F. Azul. *Proc. SPIE-Int. Soc. Opt. Eng.* 4766 (2002) 179.
26. T. Soukka, K. Kuningas, T. Rantanen, V. Haaslahti, T. Lövgrenn, *J. Fluorescence* 15 (2005) 513.
27. S. Panadero, A. Gómez-Hens, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chim. Acta* 329 (1996) 135.
28. S. Panadero, A. Gómez-Hens, D. Pérez-Bendito, *Talanta* 45

- (1998) 829.
29. M.A. Caro de la Torre, A. Gómez-Hens, *Anal. Chim. Acta* 407 (2000) 53.
 30. M.P. Aguilar-Caballos, A. Gómez-Hens, D. Pérez-Bendito, *Analyst* 124 (1999) 1079.
 31. J.A. Hernández-Arteseros, R. Compañó, M.D. Prat, *Analyst* 123 (1998) 2729.
 32. B. Sendra, S. Panadero, A. Gómez-Hens, *Anal. Chim. Acta* 355 (1997) 145.
 33. M. Galtayries, M.P. Aguilar-Caballos, A. Gómez-Hens, *Luminescence* 15 (2000) 363.
 34. L. Laville, A. Rieutord, B. Prognon, G. Mahuzler, *Luminescence* 15 (2000) 127.
 35. S. Rabouan, J. Delage, W. Durand, P. Prognon, D. Barthes, *Talanta* 51(2000) 787.
 36. A.A. Hindle, E.A.H. Hall, *Analyst* 124 (1999) 1599.
 37. S. Panadero, A. Gómez-Hens, D. Pérez-Bendito, *Analyst* 120 (1995) 125.
 38. C.J. Veiopoulou, E.S. Lianidou, P.C. Ioannou, C.E. Efstathiou, *Anal. Chim. Acta* 335 (1996) 177.
 39. E.S. Lianidou, P.C. Ioannou, *Clin. Chem.* 42 (1996) 1659.
 40. N. Arnaud, J. Georges, *Analyst* 124 (1999) 1075.
 41. N. Arnaud, J. Georges, *Analyst* 125 (2000) 1487.

42. E.S. Lianidou, P.C. Ioannou, C.K. Polydorou, C.E. Efstathiou, *Anal. Chim. Acta*, 320 (1996) 107.
43. P.C. Ioannou, E.S. Lianidou, D.G. Konstantianos, *Anal. Chim. Acta* 300 (1995) 237.
44. J.G. Yang, Z.Q. Gao, N.Q. Jie, H.B. Zou, R.J. Han, W.D. Zhao, X.J. Huang, *Spectrochim. Acta, Part A* 52A (1996) 709.
45. D.Y. Wang, Y.B. Zhao, J.G. Xu, X.Q. Guo, *Fresenius J. Anal. Chem.* 358 (1997) 514.
46. Y.B. Zhao, D.Y. Wang, X.Q. Guo, J.G. Xu, *Anal. Chim. Acta* 353 (1997) 329.
47. R.A. Evangelista, A. Pollak, E.F. Gudgin-Templeton, *Anal. Biochem.* 197 (1991) 213.
48. E.F. Gudgin-Templeton, H.E. Wong, R.A. Evangelista, T. Granger, A. Pollak, *Clin.Chem.* 37 (1991) 1506.
49. P. Radovich, S. Bortolin, T.K. Christopoulos, *Anal. Chem.* 67 (1995) 2644.
50. P.C. Ioannou, T.K. Christopoulos, *Anal. Chem.* 70 (1998) 698.
51. S. Sueda, T. Ihara, B. Juskowiak, M. Takagi, *Anal. Chim. Acta* 365 (1998) 27.
52. D.L. Rosen, C. Sharpless, L.B. McGown, *Anal. Chem.* 69 (1997) 1082.
53. P.M. Pellegrino, N.F. Fell, D. L. Rosen, J.B. Gillespie, *Anal. Chem.* 70 (1998) 1755.

54. D.L. Rosen, *Rev. Anal. Chem.* 18 (1999) 1.
55. P.C. Ioannou, N.V. Rusakova, D.A. Andrikopoulou, K.M. Glynou, G.M. Tzompanaki, *Analyst* 123 (1998) 2839.
56. A. Egorova, S. Beltyukova, *J. Fluorescence* 9 (1999) 245.
57. N. Arnaud, S. Drevet, J. Georges, *Analyst* 119 (1994) 2453.
58. M.P. Aguilar-Caballos, A. Gómez-Hens, D. Pérez-Bendito, *Talanta* 48 (1999) 209.
59. R. García, P. Gutiérrez, I. Hernández, P.J. Martínez, E. Rodríguez, A. El-Bekkouri, *Luminescence* 15 (2000) 73.
60. A. Egorova, S. Beltyukova, O. Teslyuk, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 21 (1999) 585.
61. H. Zhao, R. Feng, X. Den, L. Jin, *Anal. Lett.* 21 (1995) 819.
62. S. Panadero, A. Gómez-Hens, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chim. Acta* 280 (1993) 163.
63. S. Panadero, A. Gómez-Hens, D. Pérez-Bendito, *Fresenius J. Anal. Chem.* 357 (1997) 80.
64. M.A. Kessler, *Anal. Chim. Acta* 364 (1998) 125.
65. M.P. Aguilar-Caballos, A. Gómez-Hens, D. Pérez-Bendito, *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000) 312.
66. E. Soini, *Trends Anal. Chem.* 9 (1990) 90.
67. A. Canfi, M.P. Bailey, B.F. Rocks, *Analyst* 114 (1989) 1407.
68. K.D. Brandt, K.E. Schnobrich, D.K. Johnson, *Bioconjugate Chem.* 2 (1991) 67.

Nuevas estrategias metodológicas mediante iones lantánidos aplicables al análisis de rutina

69. S.V. Beltyukova, A.V. Egorova, O.I. Teslyuk, J. Anal. Chem. 55 (2000) 682.
70. I. Hemmilä, V.M. Mikkala, M. Latva, P. Kiilholma, J. Biochem. Biophys. Methods 26 (1993) 283.
71. S.V. Beltyukova, A.V. Egorova, J. Pharm. Biomed. Anal. 18 (1998) 267.
72. M.P. Aguilar-Caballeros, H. Härmä, M. Tuomola, T. Lövgren, A. Gómez-Hens, Anal. Chim. Acta 460 (2002) 271.
73. C.T. Elliott, K.S. Francis, W.J. McCaughey, Analyst 119 (1994) 2565.
74. H. Härmä, P. Aronkylö, T. Lövgren, Anal. Chim. Acta 410 (2000) 85.
75. S. Eriksson, M. Vehniainen, T. Jansen, V. Meretoja, P. Saviranta, K. Pettersson, T. Lövgren, Clin Chem. 46 (2000) 658.
76. Y.Y. Xu, K. Pettersson, K. Blomberg, I. Hemmilä, H. Mikola, T. Lövgren, Clin. Chem. 38 (1992) 2038.
77. K. Blomberg, P. Hurskainen, I. Hemmilä, Clin. Chem. 45 (1999) 855.
78. Y. Xu, I.A. Hemmilä, T.N. Lövgren, Analyst 117 (1992) 1061.
79. V. Väisänen, H. Härmä, H. Lilja, A. Bartell, Luminescence 15 (2000) 389.
80. H. Härmä, T. Soukka, S. Lönnberg, J. Paukkunen, T. Lövgren, Luminescence 15 (2000) 351.

81. H. Härmä, T. Soukka, T. Lövgren, *Clin. Chem.* 47 (2001) 1269.
82. H. Härmä, T. Soukka, J. Paukkunen, T. Lövgren, *Anal. Chem.* 73 (2001) 2254
83. T. Soukka, J. Paukkunen, H. Härmä, S. Lönnberg, H. Lindroos, T. Lövgren, *Clin. Chem.* 47 (2001) 1269.
84. T. Soukka, K. Antonen, H. Härmä, A.M. Pelkkikangas, P. Huhtinen, T. Lövgren *Clin. Chim. Acta* 328 (2003) 157.
85. H. Härmä, A.M. Pelkkikangas, T. Soukka, P. Huhtinen, S. Huopalahti, T. Lövgren *Anal. Chim. Acta* 482 (2003) 157.
86. L. Kokko, K. Sandberg, T. Lövgren, T. Soukka, *Anal. Chim. Acta* 503 (2004) 155.
87. E.P. Diamandis, *Analyst* 117 (1992) 1879.
88. E.S. Lianidou, P.C. Ioannou, E. Sacharidou, *Anal. Chim. Acta* 290 (1994) 159.
89. A. Papanastasiou-Diamandis, T.K. Christopoulos, E.P. Diamandis, *Clin. Chem.* 38 (1992) 545.
90. T.K. Christopoulos, E.P. Diamandis, *Anal. Chem.* 64 (1992) 342.
91. H. Yu, E.P. Diamandis, *Clin. Chem.* 39 (1993) 2108.
92. H. Yu, E.P. Diamandis, A.F. Prestigiacomo, T.A. Stamey, *Clin. Chem.* 41 (1995) 430.
93. D.N. Melegos, E.P. Diamandis, H. Oda, Y. Urade, O. Hayaishi, *Clin. Chem.* 42 (1996) 1984.

Nuevas estrategias metodológicas mediante iones lantánidos aplicables al análisis de rutina

94. N. Zarghami, H. Yu, E.P. Diamandis, D.J.A. Sutherland, Clin. Biochem. 28 (1995) 243.
95. C. Petrovas, S.M. Daskas, E.S. Lianidou, Clin. Biochem. 32 (1999) 241.
96. L.M. Bathrellos, E.S. Lianidou, P.C. Ioannou, Clin. Chem. 44 (1998) 1351.
97. T. Steinkamp, F. Schweppe, B. Krebs, U. Karst, Analyst, 128 (2003) 29.
98. T. Steinkamp, U. Karst, Anal. Bioanal. Chem. 380 (2004) 24.
99. R.A. Copeland, Anal. Biochem. 220 (1994) 218.
100. S.S. Saavedra, E.G. Picozza, Analyst 114 (1989) 835.
101. R.E. Milofsky, E. Bauer, J. High Resolut. Chromatogr. 20 (1997) 638.
102. J.R. Petersen, M.G. Bissell, A.A. Mohammad, J. Chromatogr. 744 (1996) 37.
103. M.G. Bissell, A.O. Okorodudu, J.R. Petersen, A.A. Mohammad, J. Chromatogr. 767 (1997) 217.
104. R.E. Milofsky, M.G. Malberg, J.M. Smith, J. High Resolut. Chromatogr. 17 (1994) 731.
105. R. Milofsky, S. Spaeth, Chromatographia 42 (1996) 12.
106. J.P. Leonard, T. Gunnlaugsson, J. Fluorescence 15 (2005) 585.
107. D. Parker, Coord. Rev. Chem. 205 (2000) 109.

108. R. Ziessel, L.J. Charbonniere, J. Alloys Compounds 374 (2004) 283.
109. M. Montalti, L. Prodi, N. Zaccheroni, L. Charbonniere, L. Douce, R. Ziessel, J. Am. Chem. Soc., 123 (2001) 12694.
110. H. Kenjiro, K. Kazuya, K. Hirotatsu, U. Yasuteru, N. Tetsuo, J. Am. Chem. Soc., 126 (2004) 12470.
111. S. Blair, M.P. Lowe, C.E. Mathieu, D. Parker, P.K. Senanayake, R. Katakya, Inorgan. Chem. 40 (2001) 5860.
112. F. Alava-Moreno, M.E. Díaz-García, A. Sanz-Medel, Anal. Chim. Acta 281 (1993) 637.
113. F. Alava-Moreno, M.J. Valencia-González, M.E. Díaz-García, Analyst 123 (1998) 151.
114. R.M. Cuenca-Trujillo, M.J. Ayora-Cañada, A. Molina-Díaz, J. AOAC Int. 85 (2002) 1268.
115. E.J. Llorent-Martínez, J.F. García-Reyes, P. Ortega-Barrales, A. Molina-Díaz, Anal. Chim. Acta 532 (2005) 159.
116. E.J. Llorent-Martínez, P. Ortega-Barrales, A. Molina-Díaz, Anal. Biochem. 347 (2005) 330.
117. A. Gómez-Hens, M.P. Aguilar-Caballo, New frontiers in Drug Design & Discovery, Ed. Bentham, 1 (2005) 167.
118. X. Gao, C.K. Hsu, L.J. Heinz, J. Morin, Y. Shi, N.K. Shukla, D.L. Smiley, J. Xu, B. Zhong, L.J. Sliker, Anal. Biochem. 328 (2004) 187.

119. H.L. Handl, J. Vagner, H.I. Yamamura, V.J. Hruby, R.J. Gillies, *Anal. Biochem.* 330 (2004) 242.
120. H. Frang, V.M. Mikkala, R. Syysto, P. Ollikka, P. Hurskainen, M. Scheinin, I. Hemmilä, *Assay Drug Dev. Technol.* 1 (2003) 275.
121. K. Xu, A.S. Stern, W. Levin, A. Chua, L.T. Vassilev, J. *Biochem. Mol. Biol.* 36 (2003) 421.
122. Y. Li, R.T. Cummings, B.R. Cunningham, Y. Chen, G. Zhou, *Anal. Biochem.* 321 (2003) 151.
123. M. Preaudat, J. Ouled-Diaf, B. Alpha-Bazin, G. Mathis, T. Mitsugi, Y. Aono, K. Takahashi, H. Takemoto, *J. Biomol. Screen.* 7 (2002) 267.
124. M. Gabourdes, V. Bourguine, G. Mathis, H. Bazin, B. Alpha-Bazin, *Anal. Biochem.* 333 (2004) 105.
125. S.G. Jones, D.Y. Lee, J.F. Wright, J.N. Jones, M.L. Tear, S.J. Gregory, D.D. Burns, *J. Fluorescence* 11 (2001) 13.
126. D.L. Earnshaw, K.J. Moore, *J. Biomol. Screen.* 4 (2004) 239.
127. A. Gharehbaghian, K.M. Haque, C. Truman, J. Newman, B.A. Bradley, *J. Immunol. Methods* 260 (2002) 69.
128. K. Blomberg, R. Hautala, J. Lövgren, V.M. Mikkala, C. Lindqvist, K. Akerman, *J. Immunol. Methods* 193 (1996) 199.
129. N.S. Ivey, E.N. Martin Jr, W.M. Scheld, B.R. Nathan, *J. Neurosci. Methods* 142 (2005) 91.

CAPÍTULO I

Nuevas estrategias metodológicas mediante iones lantánidos aplicables al análisis de rutina

CAPÍTULO I

USO DE LA TECNOLOGÍA DE REACTIVOS SECOS

- I.1. Introducción
- I.2. Equipos y materiales
- I.3. Procedimientos
- I.4. Simultaneous determination of ciprofloxacin and tetracycline in biological fluids based on dual-lanthanide sensitised luminescence using dry reagent chemical technology

Nuevas estrategias metodológicas mediante iones lantánidos aplicables al análisis de rutina

Este capítulo presenta la utilización de la luminiscencia sensibilizada de lantánidos para la determinación simultánea de dos analitos mediante la tecnología de reactivos secos. Después de una breve introducción, se describen el equipo y los materiales utilizados, así como los procedimientos desarrollados. Por último, se incluye un trabajo de investigación en el que se demuestra la utilidad del terbio(III) y del europio(III) en la tecnología de reactivos secos para la determinación simultánea de los antibióticos ciprofloxacina y tetraciclina en muestras de fluidos biológicos.

I.1. INTRODUCCIÓN

La utilización de la tecnología de reactivos químicos secos es una alternativa muy atractiva frente a los métodos químicos convencionales en disolución para el desarrollo de métodos de selección o “screening” en análisis de rutina. Este formato presenta, en general, la ventaja de requerir un menor consumo de reactivos frente a los métodos en disolución.

Esta tecnología se ha aplicado ampliamente en análisis clínico y de alimentos, utilizando reactivos orgánicos clásicos, enzimas y anticuerpos. Aunque estos reactivos pueden ofrecer una gran selectividad, su preparación en los soportes sólidos resulta

relativamente compleja y su estabilidad es limitada. No obstante, se han descrito numerosos ensayos que se utilizan en analizadores discontinuos comerciales, ya sea en formato de tiras simples o multicapa. Los dispositivos comerciales con tiras simples se han utilizado para determinar, entre otros parámetros, la velocidad de coagulación [1-4].

La tecnología de multicapa es similar a la utilizada en la industria fotográfica, en la que se disponen los reactivos en varias capas, ordenadas de forma secuencial. Estas tiras pueden incluir una serie de capas diseñadas para el acondicionamiento de la muestra y la reacción del analito. Las determinaciones pueden ser semicuantitativas o cuantitativas, utilizando medidas de reflectancia o de fluorescencia. Existen analizadores comerciales basados en esta tecnología que incorporan ensayos para la determinación de parámetros bioquímicos de rutina, drogas de abuso, hormonas y marcadores tumorales y cardíacos, aplicables al análisis de fluidos biológicos [5-8].

Otro formato de ensayo utilizado generalmente con reacciones inmunoquímicas se basa en el uso de reactivos inmovilizados en puntas, cuya principal ventaja es la inherente a la química seca, es decir, su mayor estabilidad frente al formato en disolución. Al igual

que para las tiras, existe un analizador comercial que aplica esta tecnología al control de las alergias [9-11].

Los quelatos de iones lantánidos se han utilizado en la tecnología de reactivos secos como marcadores en fluorinmunoensayo de tiempo resuelto (TR-FIA) [12-16]. Estos reactivos se presentan en el formato de pocillos en los que, tras inmovilizar el anticuerpo mediante interacción con inmunoglobulinas anti-especie, se añade una capa aislante de carbohidratos y proteínas. Por último, se adiciona 1 μ l de disolución que contiene el marcador, el cual incluye al quelato lantánido, encima de dicha capa y se seca. En el momento del análisis tan sólo se requiere añadir la muestra en el medio adecuado y proceder con las etapas siguientes del inmunoensayo.

En este capítulo se describe por primera vez el uso conjunto de terbio(III) y europio(III) como reactivos secos para la determinación simultánea de los antibióticos ciprofloxacina y tetraciclina. Aunque tienen diferentes aplicaciones terapéuticas, estos antibióticos se recomiendan en el tratamiento del ántrax [17], una enfermedad infecciosa aguda causada por las bacterias formadoras de esporas *Bacillus anthracis*. Por tanto, es deseable disponer de métodos rápidos de screening que permitan el control individual o simultáneo de estos antibióticos en fluidos biológicos.

Se han descrito métodos muy sensibles para la determinación de quinolonas basados en luminiscencia sensibilizada de lantánidos [18-26], la mayoría de los cuales permite el análisis directo de las muestras biológicas. Por otro lado, se ha utilizado la luminiscencia sensibilizada de europio(III) para la determinación de tetraciclinas [27-33]. La molécula de tetraciclina actúa como un ligando bidentado a través de los grupos β -dicetónicos, formando seis anillos con el europio(III), con un máximo de emisión a 615 nm. También se ha descrito la determinación simultánea de tetraciclina y doxiciclina con europio(III) mediante metodología cinética [34].

La tecnología de reactivos secos mediante la inmovilización de terbio(III) en tiras de celulosa ha sido utilizada para la determinación de dos anestésicos locales, benzocaína y procaína, en preparados farmacéuticos [35]. El método permite la determinación individual de estos analitos tras una etapa de hidrólisis. Una vez ajustado el pH de la muestra, un pequeño volumen de ésta se adiciona a la tira de reactivo para su análisis.

REFERENCIAS

1. www.roche-diagnostics.com.ar/near_patient/coagucheck_descripcion.asp

2. G.P. Carpenter, T.G Neel, J.R. Parker, The international Society for Optical Engineering 2136 (1994) 205.
3. C.M.Samama, Y. Ozier, Vox sanguinis 84 (2003) 251.
4. T.D. Christensen, N.T. Andersen, J. Attermann, E. Hjortdal Vibeke, M. Maegaard, J M. Hasenkam, Off. J. Eur. Assoc. Cardiothoracic Surgery 23 (2003) 292.
5. www.orthoclinical.com
6. N. Ferre; J. Camps, J. Marsillach, B. Mackness, M. Mackness, B, Coll, M. Tous, J. Joven, Clin. Chem. 51 (2005) 920.
7. B. Solnica; Clin. Chem. Lab. Med. 42 (2004) 958.
8. D.F. Stickle; N.C. Birch; S.J. Pirruccello, S.H. Hinrichs; Clin. Chim. Acta 334 (2003) 253.
9. <http://www.allergietest.nl/Misc/UniCAP-manual.pdf>
- 10.N. Liappis; A. Starke, O. Lantto, B. Ryden, Clin. Lab. 45 (1999) 229.
- 11.E. Grodzinsky, A. Ivarson, P. Juto, P. Olcen, K. Falth-Magnusson, L.A. Persson, O. Hernell, Clin. Diag. Lab. Immunology 8 (2001) 564.
- 12.Q. Qin; M. Christiansen, K. Pettersson, Clin. Chem. 48 (2002) 473.
- 13.J. Nurmi; M. Kiviniemi, M. Kujanpaeae, M. Sjoeroos, J. Ilonen, T. Loevgren, Anal. Biochem. 299 (2001) 211.

14. S.R.H. Crooks, T.L. Fodey, G.R. Gilmore, C.T. Elliott, *Analyst* 123 (1998) 2493.
15. P. von Lode, J. Rosenberg, K. Pettersson, H. Takalo, *Anal. Chem.* 75 (2003) 3193.
16. L. Merio, K. Pettersson, T. Lovgren, *Clin. Chem.* 42 (1996) 1513.
17. *Martindale Extra Pharmacopoeia*, J. Reynolds Ed., 31st edition, 1996, Pharmaceutical Press, London.
18. J.A. Hernández-Arteseros, R. Compañó, R. Ferrer, M.D. Prat, *Analyst* 125 (2000) 1155.
19. C.J. Veiopolou; P.C. Ioannou, E.S. Lianidou, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 15 (1997) 1839.
20. T.L. Zhang, H.C. Zhao, I.P. Jin, *Talanta* 49 (1999) 77.
21. F. You, L. Jin, H. Zhao, *Anal. Commun.* 36 (1999) 231.
22. J.A. Ocaña, M. Callejón, F.J. Barragán, *Analyst* 125 (2000) 1851.
23. S. Panadero, A. Gómez-Hens, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chim. Acta* 303 (1995) 39.
24. Z.Y. Huang, R.X. Cai, K. Zhang, H.P. Huang, Y.N. Zeng, *Anal. Lett.* 30 (1997) 1531.
25. M. Rizk; F. Belal, F.A. Aly, N.M. El Enany; *Anal. Lett.* 30 (1997) 1897.
26. S.V. Beltyukova, E.I. Tselik, A.V. Egorova, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 18 (1998) 261.

27. T.J. Wenzel, L.M. Collette, D.T. Dahlen, S.M. Hendrickson, L.W. Yarmaloff, J. Chromatogr., Biomed. Appl. 77 (1988) 149.
28. J. Georges, S. Ghazarian, Anal. Chim. Acta 276 (1993) 401.
29. P. Izquierdo, A. Gómez-Hens, D. Pérez-Bendito, Anal. Chim. Acta 292 (1994) 133.
30. R.D. Jee, Analyst 120 (1995) 2867.
31. X.J. Liu, Y.Z. Li, Y.X. Ci, Anal. Chim. Acta 345 (1997) 213.
32. A.L. Savage, S.H. Sarijo, J. Baird, Anal. Chim. Acta 375 (1998) 1.
33. N. Arnaud, J. Georges, Analyst 126 (2001) 694.
34. P. Izquierdo, A. Gómez-Hens, D. Pérez-Bendito, Anal. Lett. 27 (1994) 2303.
35. A.M. Casas-Hernández, M.P. Aguilar-Caballos, A. Gómez-Hens, Anal. Chim. Acta, 452 (2002) 169.

I.2. EQUIPOS Y MATERIALES

I.2.1. EQUIPOS

El equipo analítico utilizado para el desarrollo de la metodología propuesta fue un espectrómetro de luminiscencia SLM Aminco (Urbana, IL, USA) AB2 equipado con una lámpara continua de xenón de 150 W y una lámpara pulsada de xenón de 7 W, controlado por

un ordenador que suministró los datos de la intensidad de luminiscencia del sistema en estudio.

- El compartimento de muestra del instrumento se reemplazó por un accesorio para medidas en superficie sólida Spectronic (NY, USA) FP-111 de ángulo variable fijado en la posición de ángulo cero. Las rendijas de excitación y emisión se ajustaron para obtener un paso de luz de 8 nm cuando se usó el modo de fluorescencia y 16 nm para el modo tiempo resuelto. En ambos casos el voltaje del detector fue 900 V.

- Cuando las medidas se realizaron en disolución se utilizó el compartimento convencional de muestra del instrumento, donde el paso de luz de la cubeta de cuarzo es de 1 cm. En este caso el voltaje del detector fue de 800 V y las rendijas de excitación y emisión se ajustaron a 8 nm para las medidas de fluorescencia, y 900 V y ambas rendijas ajustadas a 16 nm para las medidas en el modo tiempo resuelto.

También se utilizó una balanza analítica OHAUS Explorer de 110 g, que tiene una precisión de hasta 0.0001 g, con un error de ± 0.001 g, y un pHmetro Metrohm 744.

I.2.2. MATERIALES

Los reactivos utilizados para preparar las diferentes disoluciones usadas en este capítulo fueron todos de grado analítico. Las disoluciones madre de ciprofloxacina ($350 \mu\text{g ml}^{-1}$) (suministrada amablemente por Laboratorios Lesvi, Barcelona, España) y de tetraciclina ($400 \mu\text{g ml}^{-1}$) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) se prepararon a partir de sus clorhidratos en agua destilada y se almacenaron a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$, siendo estables durante un mes. Las disoluciones de trabajo se prepararon diariamente en agua destilada.

Para preparar las disoluciones de terbio(III) y europio(III), ambas con concentraciones $10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$, se disolvieron las cantidades apropiadas de $\text{Tb}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Aldrich) en agua destilada. También se prepararon disoluciones acuosas de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) ($5 \times 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$), sacarosa (1 mol l^{-1}) y tris(hidroximetilamino)metano (Tris) (0.4 mol l^{-1} , pH 7.3). Como soporte sólido se utilizó papel cromatográfico Whatman nº 1.

I.3. PROCEDIMIENTOS

I.3.1. ACONDICIONAMIENTO DE LAS TIRAS DE REACTIVO

El papel cromatográfico Whatman nº 1 se cortó en tiras rectangulares de 3.5 x 2.5 cm y se sumergieron en una disolución de sacarosa 1 mol l⁻¹ durante 50 minutos a temperatura ambiente. A continuación se secaron las tiras durante 10 minutos en una estufa a 40 °C y se dejaron enfriar en un desecador, con CaCl₂ como agente desecante, durante 10 minutos. Posteriormente se marcó un círculo en cada tira, de 7 mm de diámetro, en la posición en la que incide el haz de radiación y se depositaron 6 µl de una disolución que contenía terbio(III) y europio(III), ambos a una concentración 6 x 10⁻⁵ mol l⁻¹, en el punto marcado en la tira. Para ello se utilizó una micropipeta PET Biohit. Las tiras se secaron de nuevo en la estufa durante 5 minutos a 40 °C y se almacenaron en el desecador, quedando preparadas para su uso. Bajo estas condiciones las tiras son estables durante al menos 6 meses.

1.3.2. DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE TETRACICLINA Y CIPROFLOXACINA

Una disolución (6 μl) que contiene CTAB ($3 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$), Tris (0.04 mol l^{-1}) y estándares o muestras de ciprofloxacina ($0.03\text{-}1.5 \mu\text{g ml}^{-1}$) y/o tetraciclina ($0.03\text{-}2.5 \mu\text{g ml}^{-1}$) se deposita dentro del círculo marcado en la tira de reactivo y se seca en la estufa durante 5 minutos a 40°C . Después de permanecer en el desecador durante 10 minutos, la tira se coloca en el compartimento de muestra y se mide la intensidad de luminiscencia a $\lambda_{\text{ex}} 284 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} 545 \text{ nm}$ para la ciprofloxacina y a $\lambda_{\text{ex}} 395 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} 615 \text{ nm}$ para la tetraciclina.

Se utiliza el modo tiempo resuelto, seleccionando un tiempo de espera de 0.03 ms, un tiempo de integración de 2 ms y una duración de ciclo de 10 ms. Cada estándar o muestra se ensaya por triplicado y la señal del blanco se resta para cada medida.

1.3.3. ANÁLISIS DE MUESTRAS DE SUERO Y ORINA

Cada muestra de suero (700 μl) se trata con 1.4 ml de acetonitrilo para eliminar las proteínas. La suspensión se centrifuga a 2000 rpm durante 10 minutos y se toman 1.5 ml de sobrenadante para ser tratado según el procedimiento indicado anteriormente. Las

Nuevas estrategias metodológicas mediante iones lantánidos aplicables al análisis de rutina

muestras de orina se diluyen 10 veces y 40 μ l de cada muestra se tratan según el procedimiento mencionado anteriormente. En ambos casos, el volumen final de la muestra es 10 ml.

I.4. SIMULTANEOUS DETERMINATION OF CIPROFLOXACIN AND TETRACYCLINE IN BIOLOGICAL FLUIDS BASED ON DUAL-LANTHANIDE SENSITISED LUMINESCENCE USING DRY REAGENT CHEMICAL TECHNOLOGY

Trabajo publicado en la revista "Analytica Chimica Acta" (2003, 494, 55-62).

Nuevas estrategias metodológicas mediante iones lantánidos aplicables al análisis de rutina

**SIMULTANEOUS DETERMINATION OF CIPROFLOXACIN AND
TETRACYCLINE IN BIOLOGICAL FLUIDS BASED ON DUAL-
LANTHANIDE SENSITISED LUMINESCENCE USING DRY
REAGENT CHEMICAL TECHNOLOGY**

R.C. Rodríguez-Díaz, M.P. Aguilar-Caballo and A. Gómez-Hens
Department of Analytical Chemistry, University of Córdoba, Anexo C-3,
Campus of Rabanales, E-14071 Córdoba, Spain

ABSTRACT

Terbium(III) and europium(III) have been used as dry reagents for the simultaneous determination of ciprofloxacin and tetracycline in serum and urine samples. These lanthanide ions were immobilised by adsorption in paper strips, which were previously treated with sucrose. The terbium(III)-ciprofloxacin chelate presents an intense luminescence at λ_{ex} 284 nm and λ_{em} 545 nm and the europium(III)-tetracycline chelate does it at λ_{ex} 395 nm and λ_{em} 615 nm. Luminescence measurements have been performed using the time-resolved mode. The linear range of the calibration graphs using standard solutions are 0.03-1.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ for ciprofloxacin and 0.03-2.5

$\mu\text{g ml}^{-1}$ for tetracycline and the calculated detection limits are 9 and 11 ng ml^{-1} , for ciprofloxacin and tetracycline, respectively. Quantification limits in the original human urine and serum samples were 125 and 1.3 $\mu\text{g ml}^{-1}$, respectively for ciprofloxacin, and 75 and 0.8 $\mu\text{g ml}^{-1}$, respectively, for tetracycline. The features of the dry-reagent method have been compared to those provided by the measurements carried out in solution. Mixtures of ciprofloxacin and tetracycline ranged in ratios between 5:1 and 1:10 were satisfactorily resolved with errors under 6% using the dry reagent method, which was applied to the analysis of several serum and urine samples with recoveries ranging from 88.7 to 109.3%.

Keywords: Dry reagent strips, terbium(III), europium(III), ciprofloxacin, tetracycline, biological fluids.

1. INTRODUCTION

Ciprofloxacin (CIP) and tetracycline (TET) are two representative components of fluoroquinolones and tetracyclines, respectively, two antimicrobial groups widely used in numerous infections [1]. The determination of these compounds in biological fluids is usually carried out by using liquid chromatographic methods involving UV, fluorimetric, electrochemical and, in some cases, mass spectrometry detection. The features of these methods have been widely discussed in several recent review articles [2-5]. Quantification limits reported for CIP and TET are at the nanogram per milliliter levels. While chromatographic methods allow the separation and quantification of several fluoroquinolones or tetracyclines, including CIP and TET, other analytical methods reported for their determination cannot distinguish between the different components of each group. For instance, two sensors have been described for the determination of TET in urine [6, 7], which shows a similar response for oxytetracycline, chlortetracycline and doxycycline. In spite of this limitation, it is desirable the availability of fast screening methods which allow the individual or simultaneous control of these antibiotics in human biological fluids.

A number of these type of methods have been described for the determination of several fluoroquinolones and tetracyclines in biological fluids, which are based on lanthanide-sensitised luminescence. This is a selective and fast approach that shows a large Stokes shift, narrow emission bands and a long luminescence lifetime, which allows the time-resolved mode to be used in order to avoid potential background interferences from the sample matrix [8-10]. The carboxylic and the keto oxygens of quinolones are involved in complexation with terbium(III) ions, giving rise to strong luminescent chelates with maximum emission at 545 nm, their intensity depending on the substituent attached to the nitrogen atom of the pyridone ring. Highly sensitive methods for the determination of CIP [11], pefloxacin [11], lomefloxacin [12], enoxacin [13], levofloxacin [14] and norfloxacin [11, 15, 16] have been described. Most of these methods allow the direct analysis of biological samples, or only require a simple prior deproteinization or extraction step. Europium-sensitised luminescence has been widely used for the determination of tetracyclines [17-20]. The tetracycline molecule can act as a bidentate ligand through its β -diketone group to form six membered rings with europium(III), which emits at 615 nm. Methods for the individual determination of TET, oxytetracycline, chlortetracycline and doxycycline have been reported [20]. Also, the simultaneous determination of TET and doxycycline with

europium(III) as reagent has been described by using kinetic methodology [21]. Because lanthanide ions have a high number of coordination sites [22], water molecules can be included into the coordination sphere of the ion, which decrease the luminescence. However, the presence of a micellar medium and/or the formation of a ternary complex using a second ligand that displaces water molecules from the ligand field has been usually used to improve the luminescence of these systems in solution. In spite of the high sensitivity of the methods based on lanthanide-sensitised luminescence and the lack of overlapping between the emission wavelengths of terbium(III) and europium(III), which could allow the independent measurement of each luminescent system, the joint use of these lanthanide ions for the simultaneous determination of fluoroquinolones and tetracyclines has not been studied up to date.

This paper describes the joint behaviour of Tb(III)-CIP and Eu(III)-TET systems by using dry-reagent technology with the aim of establishing a simple and rapid screening method for the determination of both antibiotics in biological fluids, which could be extended to the determination of other fluoroquinolones and tetracyclines mixtures. Although the behaviour of these systems in solution has been also studied here with comparative purposes, the dry reagent format has been chosen because it is an attractive

alternative to conventional wet chemical methods in routine analysis. Classical organic reagents, enzyme and antibodies have been usually used in dry reagent chemical tests, but the inorganic nature of lanthanide ions simplifies the immobilisation step and improves the stability and life of the prepared strips. This technology has been previously applied to the determination of the local anaesthetics benzocaine and procaine in pharmaceutical samples [23] using terbium(III) as dry reagent. These anaesthetics release p-aminobenzoic acid after a hydrolysis step in alkaline medium, which reacts with the immobilised terbium(III) giving an intense luminescence. In this instance, the immobilisation of terbium(III) and europium(III) allows the simultaneous determination of two analytes using dual-sensitised luminescence. The proposed method has been applied to the analysis of serum and urine samples, which are more complex matrices than pharmaceutical samples. A precedent of the joint use of terbium(III) and europium(III) can be found in a multiplex immunoassay [24] described for the determination of free and total prostate specific antigen, where the corresponding chelates are used as labels and immobilised onto beads.

2. EXPERIMENTAL

2.1. Instrumentation

A SLM Aminco (Urbana, IL, USA) AB2 luminescence spectrometer equipped with a 150 W continuous xenon lamp and a 7 W pulsed xenon lamp was used. The conventional cell compartment of the instrument was used to obtain time-resolved measurements in solution but it was replaced by a Spectronic (New York, USA) FP-111 variable angle front surface accessory fixed in the zero angle position to perform solid surface time-resolved measurements.

2.2. Reagents

All chemicals used were of analytical grade. Stock solutions of ciprofloxacin ($350 \mu\text{g ml}^{-1}$) (kindly supplied by Lesvi Laboratories, Barcelona, Spain) and tetracycline (Sigma) ($400 \mu\text{g ml}^{-1}$) were prepared from their hydrochlorides in distilled water and stored at 4 °C for a month. Working solutions were daily prepared in distilled water. A 10^{-3} M terbium (III) and a 10^{-3} M europium (III) solutions were prepared by dissolving the appropriate amount of $\text{Tb}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ or $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Aldrich) in distilled water. Also, aqueous solutions of cetyltrimethylammonium bromide (CTAB)

(5×10^{-2} M), sucrose (1 M) and tris(hydroxymethylamino)metane (Tris) (0.4 M, pH 7.3) were prepared. Whatman no. 1 chromatography paper was used as solid substrate.

2.3. Procedures

2.3.1. Preparation of reagent strips

Whatman no. 1 paper was cut into 3.5 x 2.5 cm rectangular strips, which were introduced into an 1 M sucrose solution for 50 min, at room temperature. Then, they were dried for 10 min at 40°C in oven and let to cool in a desiccator with CaCl_2 as desiccant agent for 10 min. A 7 mm diameter ring mark was put on the position covered with the excitation light spot and 6 μL of a solution containing terbium(III) (6×10^{-5} M) and europium(III) (6×10^{-5} M) was applied onto the ring mark using a PET Biohit micropipette. The strip was dried again for 5 min at 40 °C in oven and stored in the desiccator ready for its use. Under these conditions, strips can be stable for at least 6 months.

2.3.2. Simultaneous determination of ciprofloxacin and tetracycline

A 6- μ L of a solution containing CTAB (3×10^{-3} M), Tris (0.04 M), ciprofloxacin (0.03-1.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$) and/or tetracycline (0.03-2.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$) standards or samples was dispensed onto the ring mark of the strip and dried for 5 min at 40 °C in oven. The strip was kept in the desiccator for 10 min and then, it was fixed to the sample holder for measuring the luminescence intensities at λ_{ex} 284 and λ_{em} 545 nm for ciprofloxacin and λ_{ex} 395 and λ_{em} 615 nm for tetracycline. The time resolved mode of the instrument was used, with delay and gate times of 0.03 and 2 ms. The cycle time used was 10 ms. Each standard or sample was assayed in triplicate. The blank signal was subtracted from each measurement.

2.3.3. Analysis of serum and urine samples

Each serum sample (700 μ l) was treated with 1.4 ml of acetonitrile to remove proteins. The suspension was centrifuged at 2000 rpm for 10 min and 1.5 ml of the supernatant was taken to be treated following the procedure above mentioned. Urine samples were diluted 10-fold and 40 μ l of each sample were treated as in the

procedure above indicated. In each case, the final sample volume was 10 ml.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Study and optimisation of the luminescent systems

Figure 1 shows the excitation and emission spectra of Tb(III)-CIP (Fig. 1.A) and Eu(III)-TET (Fig.1.B) systems obtained by using the time-resolved mode, which eliminates scattering or potential fluorescence signals from the solid substrate. As can be seen, the maximum excitation and emission wavelengths are 284 and 545 nm for the Tb(III) chelate and 395 and 615 nm for the Eu(III) one. The spectra obtained in solid surface and in solution were similar, but the medium had a notable effect on the luminescence lifetimes (τ) obtained for each system at its corresponding wavelengths. The τ values obtained for the Tb(III)-CIP system were 0.93 and 0.63 ms in solid surface and in solution, respectively, and those obtained for the Eu(III)-TET system were 0.06 and 0.035 ms, respectively, which show the influence of solid support on the stabilization of the excited state. These τ values are suitable for using the time-resolved mode, which improves the selectivity of these systems, as it is shown later. The lack of spectral overlapping between both systems allows the direct measurement of each analyte at the corresponding excitation

and emission wavelengths, avoiding the use of mathematical procedures.

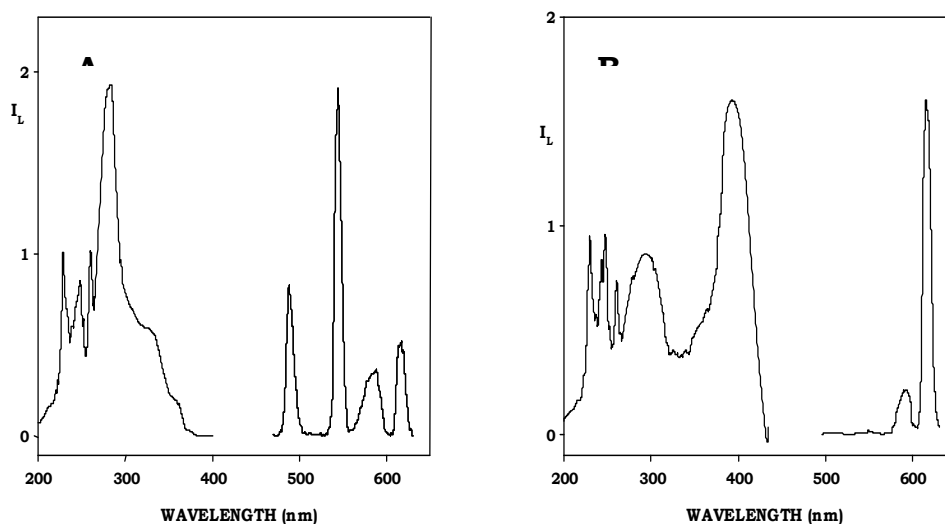


Figure 1. Excitation and emission spectra of Tb(III)-CIP (A) and Eu(III)-TET (B). (Spectra were obtained at the corresponding excitation and emission maximum). Experimental conditions: [CIP] = $0.3 \mu\text{g ml}^{-1}$; [TET] = $1.5 \mu\text{g ml}^{-1}$; [Tb(III)] = $6 \times 10^{-5} \text{ M}$; [Eu(III)] = $6 \times 10^{-5} \text{ M}$; pH = 7.3; [Tris] = 0.04 M ; [CTAB] = $3 \times 10^{-3} \text{ M}$

Filter paper was chosen as solid support, taking into account the results described elsewhere [23], and treated as described above. The formation of sucrose microcrystals has several positive effects: they minimise the potential irregularities of the paper, which allows

the precision to be improved, eliminate moisture from the substrate [25] and protect the chelates from collisional deactivation processes. The concentration of the terbium(III) and europium(III) solution applied onto the ring mark is a critical variable. When it is relatively high, about 10^{-3} M, an interaction between the luminescence of both systems was observed. However, this effect was practically negligible at lower concentrations of these lanthanide ions, as Figures 2.A and 2.B show. A 6×10^{-5} M concentration was chosen for each ion. The study was also carried out in solution, finding a similar behaviour.

The influence of pH was investigated in the range 4-9 for both systems. The values given correspond to the pH of the solutions containing the analytes. The optimum pH range for the Tb(III)-CIP and Eu(III)-TET chelates was 5.3-6.3 and 7.3-8.5, respectively. A pH of 7.3 was chosen to adjust the pH of the analytes solution because the luminescence of the Tb(III)-CIP chelate at this pH is the 80% of that obtained at its optimum pH range, while the luminescence of the Eu(III)-TET chelate decreases about a 50% when the pH is 6.3. Triethanolamine and tris buffer solutions were assayed to adjust the pH. The luminescence of both chelates notably decreased in the presence of triethanolamine but it did not depend on the tris buffer solution in the concentration range 0.02-0.06 M.

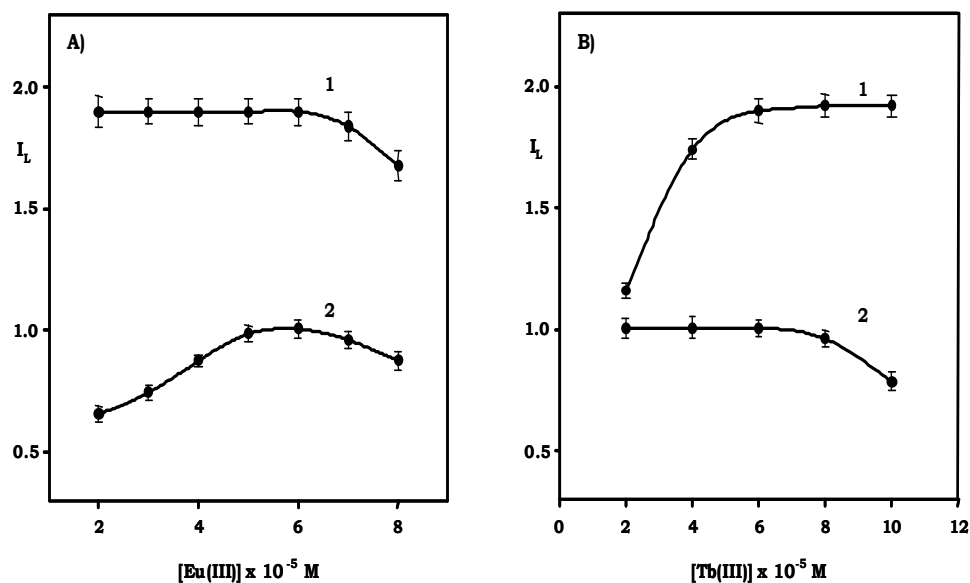


Figure 2. Effect of europium(III) (A) and terbium(III) (B) concentration on the luminescence of CIP (1) and TET (2) systems. Experimental conditions: $[\text{CIP}] = 0.3 \mu\text{g ml}^{-1}$; $[\text{TET}] = 1 \mu\text{g ml}^{-1}$; $\text{pH} = 7.3$; $[\text{Tris}] = 0.04 \text{ M}$; $[\text{CTAB}] = 3 \times 10^{-3} \text{ M}$. In (A) a $6 \times 10^{-5} \text{ M}$ $[\text{Tb(III)}]$ was used, and in (B) a $6 \times 10^{-5} \text{ M}$ $[\text{Eu(III)}]$ was used

As indicated above, lanthanide-sensitised luminescence can be enhanced using a second ligand [8,9]. Thus, the influence of different concentrations of tenoyltrifluoroacetone (TTA) ($1.5 \times 10^{-8} - 2.5 \times 10^{-5} \text{ M}$), tri n-octylphosphine oxide (TOPO) ($10^{-5} - 10^{-4} \text{ M}$) and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) ($10^{-5} - 10^{-4} \text{ M}$) was assayed, obtaining similar results in solution and in solid surface. TTA enhanced the luminescence of the Eu(III)-

TET system, owing to the formation of a ternary complex as it has been described elsewhere [18], but notably decreased the signal of the Tb(III)-CIP system. The presence of TOPO did not affect the luminescence of any of both systems and, finally, EDTA did not cause any effect on the Tb(III)-CIP system but decreased the luminescence of the Eu(III)-TET system. According to the different results obtained, the use of a second ligand was discarded.

The effect of a surfactant was also investigated for both luminescent systems in solid surface and in solution. The influence of several concentrations of non-ionic, anionic and cationic surfactants was studied by using Triton X-100 (5×10^{-3} – 3×10^{-2} %), sodium dodecylsulfate (SDS) (1.5×10^{-3} – 2×10^{-2} M) and CTAB (5×10^{-4} – 10^{-2} M), respectively. Triton X-100 only caused a slight increase in the intensity of both systems. SDS also slightly improved the luminescence of the Eu(III)-TET system but notably increased the signal of the Tb(III)-CIP system. However, both systems exhibited an increase in their luminescence in presence of CTAB, which was 35% for the Eu(III)-TET and 45% for Tb(III)-CIP when the CTAB concentration was 3×10^{-3} M.

3.2. Analytical features of the proposed methods

Under optimum conditions, the linear range of the calibration graphs obtained for CIP (λ_{ex} 284, λ_{em} 545 nm) and TET (λ_{ex} 395, λ_{em} 615 nm) using the dry reagent technology were 0.03-1.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ and 0.03-2.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$, respectively. The regression equations were $I_L = (0.07 \pm 0.02) + (6.3 \pm 0.2) [\text{CIP}]$ and $I_L = (0.05 \pm 0.03) + (1.0 \pm 0.1) [\text{TET}]$, where [CIP] and [TET] are the analyte concentrations, which are expressed in $\mu\text{g ml}^{-1}$. Correlation coefficients were 0.995 and 0.994 for CIP and TET, respectively, which suggest good linearity in the calibration. The detection limits (LODs), calculated according to IUPAC recommendations [26], were 9 and 11 ng ml^{-1} for CIP and TET, respectively, while the values obtained in solution were 0.6 and 20 ng ml^{-1} , respectively. The lower LOD of CIP in solution could be ascribed to the fact that the blank signal is lower than that obtained in solid surface, which also gives rise to a lower blank standard deviation. On the contrary, the LOD obtained for TET in solution is slightly higher than that obtained in solid surface. It has been described [27] that the luminescence of europium(III) chelates is more sensitive to slight changes in the environment than that of terbium(III) chelates. However, the solid support protects the Eu(III)-TET chelate from these changes, which

could justify the lower LOD obtained by using dry-reagent technology.

The precision was also evaluated by assaying two different analyte concentrations, 0.1 and 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$, and comparing the relative standard deviation (RSD) values obtained in solid surface and in solution. As Table 1 shows, the RSDs in solid surface are only slightly higher, which can be ascribed to the positive effect of the previous treatment of the strips with sucrose minimising the irregularities of the filter paper.

The method was applied to solutions containing known CIP and TET concentrations in different ratios. The results obtained are listed in Table 2. The proposed method allows the simultaneous determination of CIP and TET mixtures in ratios from 5:1 to 1:10 with errors not greater than 6%.

Table 1. Precision values obtained for CIP and TET in solid surface and in solution

	Concentration ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Dry-reagent ^a	Solution ^a
CIP	0.1	5.5	5.0
	1.0	4.2	3.9
TET	0.1	5	4.8
	1.0	2.3	1.5

^aUnits: % RSD

Table 2. Resolution of CIP and TET mixtures

CIP-TET mixtures	<u>CIP/$\mu\text{g ml}^{-1}$</u>		<u>TET/$\mu\text{g ml}^{-1}$</u>	
	Taken	Found ^a	Taken	Found ^a
5:1	1	1.05 \pm 0.03	0.2	0.204 \pm 0.004
3:1	0.6	0.6 \pm 0.2	0.2	0.193 \pm 0.002
2:1	0.2	0.197 \pm 0.004	0.1	0.101 \pm 0.006
1.5:1	0.3	0.31 \pm 0.01	0.2	0.19 \pm 0.01
1:1	0.1	0.095 \pm 0.002	0.1	0.102 \pm 0.003
1:2	0.1	0.105 \pm 0.002	0.2	0.197 \pm 0.008
1:5	0.1	0.098 \pm 0.003	0.5	0.52 \pm 0.03
1:7.5	0.2	0.19 \pm 0.01	1.5	1.47 \pm 0.04
1:10	0.15	0.158 \pm 0.007	1.5	1.49 \pm 0.03

^aMean \pm SD

The selectivity of the proposed methods was investigated in solid surface and in solution by assaying several antibiotics (Table 3). Glycopeptides such as vancomycin and aminoglycosides such as gentamycin and neomycin did not interfere with the determination of both analytes. All the quinolone antibiotics assayed interfered in the determination of CIP because of their similar structure, but did not affect to the TET system, although they were tolerated at a higher

concentration in the solid surface method. In the case of the tetracycline antibiotics assayed, all of them interfered in the TET system in solution, but two of them, demeclocycline and chlortetracycline were tolerated at the same concentration level than TET in the solid surface method. These results shows that a better selectivity can be obtained when dry-reagent technology is used. The potential interference of salicylate was also investigated by using time-resolved measurements because it forms a luminescent chelate with terbium(III) in the presence of a second ligand [28], usually EDTA, and it can be present in clinical samples. As Table 3 shows, it is tolerated at a concentration 50-fold and 30-fold higher than that of CIP by using solid surface and solution measurements, respectively. However, the study of the potential interference of this compound by using fluorescence measurements instead of time-resolved measurements showed that it only can be tolerated up to a concentration level 3-fold higher than that of the analyte. This effect could be ascribed to the rapid decay of the luminescence of the terbium-salicylate chelate in the absence of any synergistic ligand, which allows the interference of salicylate to be avoided when time-resolved measurements are obtained

Table 3. Influence of foreign substances over the determination of 0.3 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of each analyte

Compound	<u>Dry reagent^a</u>		<u>Solution^a</u>	
	CIP	TET	CIP	TET
Vancomycin	25	25	20	20
Salicylate	15	15	10	15
Neomycin sulphate	13	10	15	13
Gentamycin sulphate	13	10	15	13
Demeclocycline	10	0.3	3	---
Chlortetracycline	10	0.3	3	---
Oxytetracycline	7	---	3	---
Doxycycline	5	---	3	---
Norfloxacin	---	5	---	2
Pefloxacin	---	5	---	2

^aMaximum tolerated concentration expressed in $\mu\text{g ml}^{-1}$

3.3. Applications

The aim of this study was to show the usefulness of terbium(III) and europium(III) as dry reagents for the simultaneous determination of

CIP and TET in samples with a complex matrix such as human urine and serum samples. Calibration data and detection limits given above were obtained by using standards prepared in water. However, the presence of a 0.04% of urine caused a decrease of ca. 30% in the slope of the calibration graph obtained for CIP, but it did not affect to that obtained for TET. In the presence of a 5% of serum, the slopes of the calibration graphs obtained for both CIP and TET decreased ca. 40%. Under these conditions, quantification limits in the original urine and serum samples are 125 and 1.3 $\mu\text{g ml}^{-1}$ for CIP and 75 and 0.8 $\mu\text{g ml}^{-1}$ for TET. These concentrations are low enough for CIP and TET to be determinable at their therapeutic levels in urine and serum, which are 300-500 $\mu\text{g ml}^{-1}$ for CIP and up to 300 $\mu\text{g ml}^{-1}$ for TET in urine, and up to 2.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ and 1-5 $\mu\text{g ml}^{-1}$, respectively, in serum [1].

Urine and serum samples were analysed following the procedure above mentioned and using the standard addition method. The recovery study was carried out adding three different amounts of each analyte to the corresponding sample, so that the final concentration was within the therapeutic range, and subtracting the results from similarly prepared unspiked samples. Table 4 shows the recoveries obtained, which ranged from 88.7 to 109.3%.

Table 4. Recoveries of CIP and TET added to clinical samples

Sample	CIP			TET		
	Added $\mu\text{g ml}^{-1}$	Found $\mu\text{g ml}^{-1}$	Recovery %	Added $\mu\text{g ml}^{-1}$	Found $\mu\text{g ml}^{-1}$	Recovery %
Urine 1	150	158±6	105.4	150	136±6	90.4
	250	260±10	104.8	250	252±5	100.6
	350	358±5	102.3	350	335±6	95.7
Urine 2	150	139±5	92.7	150	162±7	107.3
	250	249±4	99.6	250	251±6	100.4
	350	336±7	96.1	350	383±1	109.3
Urine 3	150	133±5	88.7	150	143±1	95.3
	250	252±8	100.8	250	252±7	100.8
	350	348±6	99.4	350	377±9	107.7
Urine 4	150	143±2	95.3	150	133±4	88.7
	250	240±9	96.0	250	248±10	99.2
	350	313±8	89.4	350	360±1	102.9
Urine 5	150	136±6	90.7	150	151±10	100.7
	250	263±1	105.2	250	246±9	98.4
	350	332±5	94.9	350	353±6	100.9
Serum 1	1.5	1.51±0.04	100.4	1.5	1.51±0.06	100.8
	2.5	2.47±0.06	98.9	2.5	2.29±0.02	91.6
	3.0	3.1±0.1	104.5	3.0	3.07±0.05	102.3
Serum 2	1.5	1.37±0.06	91.3	1.5	1.52±0.05	101.2
	2.5	2.44±0.07	97.6	2.5	2.5±0.1	98.3
	3.0	3.1±0.1	103.0	3.0	3.06±0.08	101.9
Serum 3	1.5	1.42±0.09	94.7	1.5	1.52±0.05	101.3
	2.5	2.57±0.03	102.6	2.5	2.4±0.1	97.5
	3.0	3.0±0.1	98.5	3.0	3.02±0.07	100.8
Serum 4	1.5	1.44±0.07	96.3	1.5	1.51±0.06	100.8
	2.5	2.2±0.1	89.2	2.5	2.29±0.1	91.6
	3.0	3.05±0.09	101.5	3.0	3.07±0.05	102.3

^aMean ± SD

The mean recoveries were 97.8% and 99.6% for CIP and TET, respectively.

4. CONCLUSIONS

This paper presents a suitable dry reagent method for routine analysis, in which the use of dual-sensitised luminescence lanthanide has been proven to achieve the simultaneous determination of CIP and TET in clinical samples. The independence of the reactions involved in both systems under the experimental conditions chosen enables the elimination of mathematical procedures commonly used when spectral overlapping occurs. The use of dry reagent technology provides a good expeditiousness to the method, because reagents are simply immobilised onto the strips and just the addition of sample containing the buffer and the surfactant is required. The high stability of the reagents makes possible their long-term storage. Although the usefulness of this approach has been shown using two representative components of fluoroquinolone and tetracycline antimicrobial groups, it could be easily extended as a screening method to the determination of other compounds which belong to these type of antibiotics.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors gratefully acknowledge financial support from the Spanish DGI (Dirección General de Investigación) Grant no. BQU 2000-0905.

REFERENCES

1. Martindale Extra Pharmacopoeia, J. Reynolds Ed., 31st edition, 1996, Pharmaceutical Press, London.
2. S. Joshi, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 28 (2002) 795.
3. A. Marzo, L. Dal Bo, *J. Chromatogr. A* 812 (1998) 17.
4. W.M.A. Niessen, *J. Chromatogr. A* 812 (1998) 53.
5. G. Carlucci, *J. Chromatogr. A* 812 (1998) 343.
6. Z. Gong, Z. Zhang, *Anal. Chim. Acta* 351 (1997) 205.
7. W.H. Liu, Y. Wang, J.H. Tang, G.L. Shen, R.Q. Yu, *Analyst* 123 (1998) 365.
8. A. Gómez-Hens, M.P. Aguilar-Caballo, *Trends Anal. Chem.* 21 (2002) 131.
9. J. Georges, *Analyst* 118 (1993) 1481.
10. A. Rieutord, P. Prognon, F. Brion, G. Mahuzier, *Analyst* 122 (1997) 59R.
11. C.J. Veiopolou, P.C. Ioannou, E.S. Lianidou, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 15 (1997) 1839.
12. T.L. Zhang, H.C. Zhao, I.P. Jin, *Talanta* 49 (1999) 77.
13. F. You, L. Jin, H. Zhao, *Anal. Commun.* 36 (1999) 231.
14. J.A. Ocaña, M. Callejón, F.J. Barragán, *Analyst* 125 (2000) 1851.
15. S. Panadero, A. Gómez-Hens, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chim. Acta* 303 (1995) 39.

16. Z.Y. Huang, R.X. Cai, K. Zhang, H.P. Huang, Y.N. Zeng, *Anal. Lett.* 30 (1997) 1531.
17. T.J. Wenzel, L.M. Collette, D.T. Dahlen, S.M. Hendrickson, L.W. Yarmaloff, *J. Chromatogr., Biomed. Appl.* 77 (1988) 149.
18. P. Izquierdo, A. Gómez-Hens, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chim. Acta*, 292 (1994) 133.
19. A.L. Savage, S.H. Sarijo, J. Baird, *Anal. Chim. Acta* 375 (1998) 1.
20. N. Arnaud, J. Georges, *Analyst* 126 (2001) 694.
21. P. Izquierdo, A. Gómez-Hens, D. Pérez-Bendito, *Anal. Lett.* 27 (1994) 2303.
22. C.C. Bryden, C.N. Reilley, *Anal. Chem.* 54 (1982) 610.
23. A.M. Casas-Hernández, M.P. Aguilar-Caballos, A. Gómez-Hens, *Anal. Chim. Acta*, 452 (2002) 169.
24. H. Härmä, P. Aronkyto, T. Lövgren, *Anal. Chim. Acta* 410 (2000) 85.
25. H. Xie, C. Dong, W. Jin, Y. Wei, C. Liu, S. Zhang, B. Zhou, *Anal. Chim. Acta* 319 (1996) 239.
26. G.L. Long, J.D. Winefordner, *Anal. Chem.* 55 (1983) 72A.
27. T.K. Christopoulos, E.P. Diamandis, *Anal. Chem.* 64 (1992) 343.
28. S. Panadero, A. Gómez-Hens, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chim. Acta* 329 (1996) 135.

CAPÍTULO II

Nuevas estrategias metodológicas mediante iones lantánidos aplicables al análisis de rutina

CAPÍTULO II

USO DEL IÓN TERBIO(III) COMO REACTIVO DERIVATIZANTE EN CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS

- II.1. Introducción
- II.2. Equipos y materiales
- II.3. Procedimientos
- II.4. Sensitive determination of fluoroquinolone antibiotics in milk samples using time-resolved methodology
- II.5. Chromatographic determination of flumequine in food samples by post-column derivatisation with terbium (III)
- II.6. Determination of fluoroquinolones in milk samples by post-column derivatization liquid chromatography with luminescence detection
- II.7. Determination of hydroxybenzoic acids and catechins in white wine samples by liquid chromatography with luminescence detection

Nuevas estrategias metodológicas mediante iones lantánidos aplicables al análisis de rutina

Este capítulo contiene diversas investigaciones en las que se utiliza el ión terbio(III) como reactivo derivatizante en disolución para la determinación de antibióticos quinolonas y de compuestos fenólicos en alimentos. Estas investigaciones han dado lugar a cuatro artículos. En el primero de ellos se evalúa la aplicabilidad de este derivatizante para la determinación directa de fluoroquinolonas en leche. En los restantes artículos se describe su utilización para la derivatización post-columna en cromatografía líquida (LC), aplicándolo a la determinación individual y simultánea de quinolonas y a la determinación de mezclas de compuestos fenólicos. El capítulo incluye en su introducción los antecedentes bibliográficos sobre el uso de la luminiscencia sensibilizada de terbio en LC y sobre la determinación cromatográfica de los analitos en estudio. Asimismo, se describen el equipo, materiales utilizados y procedimientos propuestos.

II.1. INTRODUCCIÓN

El término derivatización se aplica al proceso de transformación de los analitos en otras especies mediante reacciones químicas irreversibles o muy favorecidas hacia la formación de los derivados. Los objetivos que se pretenden conseguir con la derivatización son diferentes, dependiendo de la técnica de separación considerada. En

LC, este proceso estará orientado a mejorar la sensibilidad y/o la selectividad analítica. Así, la derivatización puede posibilitar la detección de analitos que no originan por sí solos respuesta en el detector, o mejorar los límites de detección cuando éstos no alcanzan los niveles requeridos. También puede modificar los parámetros de retención de los analitos o conseguir que sólo las especies de interés originen señales en el detector, alterando positivamente la selectividad.

Se pueden distinguir diferentes tipos de reacciones de derivatización, dependiendo de la zona del instrumento en que ésta tenga lugar: pre-columna, post-columna o en columna. Las dos primeras opciones han sido las más utilizadas en LC. Ambas presentan ventajas e inconvenientes derivados de su intervención o no en la separación cromatográfica. La formación de derivados antes de la separación puede modificar la resolución cromatográfica. Se requiere además que los derivados formados sean estables para que no se afecte negativamente la resolución debido a la descomposición de los derivados. La modalidad post-columna presenta también algunos inconvenientes, entre los que se puede destacar que la optimización del sistema es más difícil puesto que se deben compatibilizar la separación cromatográfica y la reacción de derivatización. Otro inconveniente es que las cinéticas de

derivatización influyen en la configuración del sistema y, si éstas son lentas, afectan también a la velocidad de muestreo.

Aunque se han descrito diversas técnicas de preconcentración y “clean-up” que contribuyen a mejorar la sensibilidad y la selectividad de las determinaciones cromatográficas, la derivatización sigue siendo una opción bastante utilizada. La bibliografía sobre recientes avances en los procedimientos de derivatización en LC es muy amplia [1-10]. La utilización de distintos reactivos derivatizantes para LC con espectrometría de masas (MS) como sistema de detección se ha orientado fundamentalmente a la introducción en la molécula de grupos permanentemente cargados o fácilmente ionizables para ionización por electroaspersión (ESI), o bien grupos con gran afinidad protónica o electrónica para la ionización química a presión atmosférica (APCI) [1]. Se ha descrito la derivatización de alcoholes, fenoles, aldehídos, cetonas, tioles, ácidos carboxílicos, aminas y amidas, entre otros. Asimismo, se ha propuesto la derivatización de esteroides para su detección en fluidos biológicos mediante MS [2]. Otro ámbito en el que la derivatización tiene un especial interés es en la separación y cuantificación de fármacos quirales [5-7], como enantiómeros de fluoroquinolonas [6] o anfetaminas [7]. Los reactivos utilizados en la mayoría de estos métodos son compuestos

orgánicos, como por ejemplo los peroxioxalatos [10], cuya utilidad como reactivos derivatizantes se ha revisado recientemente.

El uso de la luminiscencia sensibilizada de terbio(III) como sistema de detección en LC ofrece una amplia variedad de posibilidades como se demuestra en la Tabla 1, donde se resumen algunas de las características de los métodos cromatográficos descritos en el modo pre- o post-columna. De forma similar a otras reacciones de derivatización en LC, cada modo posee ventajas e inconvenientes [11]. Además del ión terbio(III), también se han utilizado otros lantánidos como los iones europio(III) y samario(III) [12,13], para la determinación de aminas.

La derivatización pre-columna es más simple, pero hay que tener en cuenta el elevado consumo de terbio, que es relativamente caro. El esquema post-columna presenta las ventajas de que el terbio no afecta a la separación y que las condiciones experimentales se pueden ajustar para optimizar la sensibilidad de la detección, pero se requiere una segunda bomba para introducir el reactivo. Por ejemplo, es muy frecuente que un medio básico favorezca la luminiscencia sensibilizada, pero éste puede ser incompatible con la separación cromatográfica y la estabilidad de la columna.

Tabla 1. Aplicaciones cromatográficas de la luminiscencia sensibilizada de terbio(III)

Analito	Modo Pre/Post	Fase móvil	S/I	Modo F/TR	LD	Muestra	Referencia
Teofilina	Pre	FN/ M	S	F	9 ng ml ⁻¹	Farmacéutica	28
Dexrazoxano	Pre	FI	S	F	25 pmol	Plasma	19
Bleomicina A ₂	Pre	FI	S	F	---	---	20
Ocratoxina A Citricina	Post	FI	S	TR	3 µmol l ⁻¹ 2 µmol l ⁻¹	Queso	18
Ciprofloxacina	Post	FI	S	TR	0.1 µmol l ⁻¹	Material biológico	17
Polinucleótidos y ácidos nucleicos	Pre/Post	FI	S	F	---	---	16
Orotato	Post	FI	S	TR	10 nmol l ⁻¹	Orina	21
Aldehidos y cetonas aromáticos	Post	FI	S	F	---	---	15
Glutation	Post	FI	S	TR	20 nmol l ⁻¹	Orina	22
L-cisteína	Post	FI	S	TR	0.15 µmol l ⁻¹	Orina	23
Cromato	Post	FI	I	F	0.11 µmol l ⁻¹	Agua	24-25
Esteroides	Pre	FI/Mi	S	F	0.5 ng ml ⁻¹	Orina	29
	Post	FI/M	S	F	0.07-0.2 µg ml ⁻¹	---	30
Carboxilatos	Post	FI	S	TR	1.7-2.0 µmol l ⁻¹	---	14
Catecolaminas	Post	FI	S	F	10 ⁻⁸ -7x10 ⁻⁸ mol l ⁻¹	Orina	27

FN- Fase normal; FI- Fase invertida M: micelar; S- Sensibilización; I- Inhibición; F- Fluorescencia; TR- Tiempo resuelto; LD- Límite de detección

También hay que tener en cuenta que, el ruido de pulso de la segunda bomba y la dilución del efluente de la columna, debido a la

adición del reactivo derivatizante, son factores limitantes para conseguir límites de detección bajos.

Se ha propuesto un sistema de detección con lantánidos en fase sólida como alternativa al modo pre- o post-columna [14], que puede evitar algunas de las limitaciones anteriormente mencionadas. Los iones terbio(III) se inmovilizaron en gel de sílice mediante AEDT o DTPA covalentemente enlazado y el sólido se colocó en la célula de flujo del detector.

La mayoría de las aplicaciones cromatográficas de la luminiscencia sensibilizada de terbio(III) implican la utilización de fase invertida (Tabla 1), a pesar de que elevados contenidos de agua provocan normalmente un efecto negativo en la señal luminiscente. Sin embargo, este efecto se puede minimizar utilizando: 1) un agente desplazante para eliminar las moléculas de agua de la esfera de coordinación de los iones terbio(III), 2) una fase móvil que contenga mezcla de agua con otros disolventes, y/o 3) una fase móvil micelar que favorezca la proximidad entre el dador y el aceptor y, por tanto, la transferencia de energía.

El ión acetato fue la primera especie utilizada como agente desplazante en la determinación cromatográfica de aldehídos y

cetonas [15] y polinucleótidos y ácidos nucleicos [16]. El TOPO también se ha utilizado con el mismo fin para la determinación de ciprofloxacina [17] y para la resolución de la mezcla ocratoxina A y citrinina [18]. También, se favorece la señal luminiscente con disolventes que contienen grupos hidroxilo tales como metanol [14,15,17-20]. En algunos casos, se han utilizado fases móviles que contienen disolución reguladora Tris [21-25]. Se ha descrito que el Tris incrementa la luminiscencia sensibilizada [26], probablemente porque se introduce en la esfera de coordinación del ión lantánido dando lugar a un efecto sinérgico. El AEDT se ha utilizado también como agente desplazante para la separación de catecolaminas y su derivatización post-columna utilizando terbio en medio micelar [27].

Las fases móviles micelares se han utilizado cuando la transferencia de energía es intermolecular, es decir, debido a un mecanismo colisional desde el analito dador al ión lantánido. Sólo se ha descrito la determinación de teofilina [28] y esteroides [29,30] mediante esta metodología. El método para la teofilina se desarrolló utilizando una disolución micelar inversa en una fase móvil no acuosa, siendo necesaria la desoxigenación. Se estudió comparativamente la aplicación de la luminiscencia sensibilizada de terbio para la determinación de esteroides [29] utilizando una derivatización post-columna, en fase normal e invertida, y una

derivatización pre-columna con cromatografía en fase micelar invertida. Sólo el segundo método permitió el análisis de orina sin preparación de la muestra. También se ensayaron otros iones lantánidos pero los mejores resultados se obtuvieron con terbio(III), debido a la proximidad de la energía entre el nivel triplete del dador y el estado triplete excitado del terbio.

Los métodos que se relacionan en la Tabla 1 para la determinación de compuestos orgánicos implican la sensibilización de la luminiscencia del terbio(III), normalmente inducida por el analito. Sin embargo, cuando el analito no puede actuar como sensibilizador, se puede usar una reacción previa de derivatización para convertirlo en un compuesto sensibilizador, lo que permite extender el campo de aplicación de este sistema de detección en LC. Por ejemplo, esta metodología se ha utilizado para la determinación de tioles como glutatión [22] y L-cisteína [23]. Estos analitos se tratan, antes de la etapa de separación, con ácido 4-maleimidilalicílico, que es un reactivo derivatizante muy selectivo para compuestos tioles y, por otra parte, el grupo salicilato posee elevadas propiedades sensibilizantes de los iones terbio(III). La inhibición de la luminiscencia sensibilizada producida por algunos aniones inorgánicos tales como cromatos, se ha aplicado a la determinación cromatográfica de estas especies en aguas potables y

naturales utilizando su efecto inhibitor en el quelato terbio(III)-acetilacetato [24,25].

La luminiscencia sensibilizada de terbio(III) se ha utilizado también como sistema de detección en cromatografía plana. Se ha descrito un método de selección para la detección de siete agentes microbianos quinolonas en músculo de cerdo, después de la preparación de las muestras mediante una etapa de extracción y una etapa de limpieza por extracción en fase sólida [31].

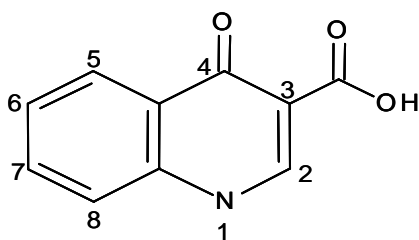
Tanto las medidas de fluorescencia como de tiempo resuelto se han utilizado para aplicaciones cromatográficas que implican el uso de terbio(III) como derivatizante, dependiendo de las características del detector disponible. Sin embargo, se puede obtener una mejora de la relación señal/ruido de unas seis veces utilizando el modo de tiempo resuelto [14]. La mayoría de los métodos cromatográficos descritos se han aplicado al análisis de materiales biológicos obteniéndose valores bastante bajos del límite de detección ($\mu\text{mol l}^{-1}$ - nmol l^{-1}).

En los trabajos experimentales que constituyen este capítulo se ha trabajado utilizando la derivatización post-columna con el ión

Nuevas estrategias metodológicas mediante iones lantánidos aplicables al análisis de rutina

terbio(III) como reactivo, para la determinación de dos grupos de compuestos diferentes, quinolonas y compuestos fenólicos.

Las quinolonas constituyen un grupo de antibióticos sintéticos clasificados por generaciones, que poseen el mismo modo de acción. Se trata de agentes antimicrobianos con diferente estructura química y actividad espectral. Su estructura básica es:



La potencia y el espectro aumentan de manera significativa cuando llevan un átomo de flúor en la posición 6 (fluoroquinolonas), siendo más activas frente a bacterias gramnegativas que las de primera generación. Además, en función de los sustituyentes existentes en las posiciones 1, 7 y 8, se verá aumentada la potencia frente a bacterias gramnegativas, grampositivas o frente a anaerobios.

Las quinolonas actúan inhibiendo enzimas (topoisomerasas) indispensables en la síntesis del ADN. Estos antibióticos se han

usado ampliamente en tratamientos veterinarios y, debido a que sus residuos pueden persistir en los alimentos, es necesario controlar la presencia de estos antibióticos en animales destinados al consumo humano [32-33].

Existe una normativa europea por la que se definen los valores de los límites máximos de residuos permitidos (MRLs) para estos compuestos [34]. También se ha revisado recientemente la legislación [35] por la que se establecen los procedimientos para el desarrollo de métodos analíticos para la determinación de residuos y la interpretación de los resultados obtenidos.

Se han descrito métodos para la determinación de quinolonas basados en la extracción en fase sólida junto con LC acoplada a MS [36] o a MS en tándem [37,38]. Debido a las propiedades fluorescentes de estos antibióticos, se han desarrollado numerosos métodos cromatográficos con detección fluorimétrica [39-51] aplicados al análisis de diversas muestras, como tejidos animales y leche, entre otras.

El otro grupo de compuestos para los que se describe un método determinativo en este capítulo lo constituyen los compuestos fenólicos, presentes en la mayoría de frutas y vegetales. Contribuyen

Nuevas estrategias metodológicas mediante iones lantánidos aplicables al análisis de rutina

al gusto de la fruta y proporcionan colores intensos a las flores, vegetales y frutas, pudiendo formar complejos metálicos en éstas, originando la decoloración de la pulpa. Los grupos más importantes por el número de compuestos que incorporan son los flavonoides, los ácidos fenólicos y los polifenoles. En la Tabla 2 se resumen algunos alimentos ricos en estos compuestos:

Tabla 2. Compuestos fenólicos en vegetales

Tipo de compuesto fenólico	Alimento o bebida		
Flavonoides	Aceituna	Apio	Judías
	Col	Vino tinto y blanco	Té
	Arándano	Cebolla	Pera
	Manzana	Lechuga	Soja
	Endibias	Brócoli	
Ácidos fenólicos	Arándano	Frambuesa	Patata
	Pera	Zumo de uva	Fresa
	Naranja	Cerezas	Café
	Uva	Manzana	
Polifenoles	Lentejas	Zumo de uva	Uva
	Guisantes	Vino tinto y blanco	

Los compuestos fenólicos son biológicamente activos, presentan actividad antioxidante de forma natural y se ha demostrado que son muy beneficiosos para quien los consume ya que disminuyen el

colesterol, la presión arterial y el riesgo a padecer enfermedades coronarias o cáncer.

Los compuestos fenólicos también están presentes en el vino, principalmente en la piel de la uva y en las pepitas. Su concentración y variedad depende de numerosos factores: la variedad de la vid, el tipo de vino, clima y terreno, una cosecha temprana o tardía, los diferentes procedimientos de prensado de la uva, el tiempo de fermentación del mosto con la piel y las pepitas, entre otros. Los principales constituyentes fenólicos del vino con capacidad antioxidante son derivados de ácidos fenólicos, ácidos cinámicos y tirosina, estilbenos y flavonoides.

Estos compuestos han sido ampliamente determinados mediante LC en diferentes muestras, tales como vino [52-61], aceite [62], fruta [63-66] y zumos [67-70].

REFERENCIAS

1. S. Gao, Z. P. Zhang, H.T. Karnes, J. Chromatogr. B 825 (2005) 98.
2. T. Higashi, K. Shimada, Anal. Bioanal. Chem. 374 (2004) 875.
3. K.R. Anumula, Anal. Biochem. 350 (2006) 1.

4. K. Nakashima, *J. Health Sci.* 51 (2005) 272.
5. Y.K. Agrawal, R. Patel, *Rev. Anal. Chem.* 21 (2002) 285.
6. J. Grellet, B. Ba, M.C. Saux, *J. Biochem. Biophys. Methods* 54 (2002) 221.
7. R. Herráez-Hernández, P. Campins-Falcó, J. Verdú-Andrés, *J. Biochem. Biophys. Methods* 54 (2002) 147.
8. P. Zuman, *Anal. Letters*, 38 (2005) 1213.
9. T. Yoshitake, J. Kehr, K. Todoroki, H. Nohta, M. Yamaguchi, *Biomed. Chromatogr.* 20 (2006) 267.
10. M. Tsunoda, K. Imai, *Anal. Chim. Acta*, 541 (2005) 13.
11. C.H. Evans, "Biochemistry of the lanthanides" Plenum Press, New York 1990 pp. 339.
12. T. Iwata, J. Koshoubu, Y. Kurosu, T. Araki, *J. Chromatogr. A*, 859 (1999) 13.
13. Y. Kurosu, T. Iwata, A. Tsuji, M. Maeda, *J. Chromatogr. A*, 787 (1997) 261.
14. T.M. Wenzel, R. Evertsen, B.E. Perrins, T.B. Light Jr., A.C. Bean, *Anal. Chem.*, 70 (1998) 2085.
15. E.E. DiBella, J.B. Weissman, M.J. Joseph, J.R. Shultz, T.J. Wenzel, *J. Chromatogr.*, 328 (1985) 101.
16. T.J. Wenzel, L.M. Collete, *J. Chromatogr.*, 436 (1988) 299.
17. A. Rieutord, L. Vazquez, M. Soursac, P. Prognon, J. Blais, P. Bourget, G. Mahuzier, *Anal. Chim. Acta*, 290 (1994) 215.

18. B.I. Vazquez, C. Fente, C. Franco, A. Cepeda, P. Prognon, G. Mahuzier, *J. Chromatogr. A*, 727 (1996) 185.
19. B.B. Hasinoff, *J. Chromatogr. B, Biomed. Appl.*, 656 (1994) 451.
20. T.J. Wenzel, K. Zomlefer, S.B. Rapkin, R.H. Keith, *J. Liq. Chromatogr.*, 18 (1995) 1473.
21. M. Schreurs, J.P.C. Vissers, C. Gooijer, N.H. Velthorst, *Anal. Chim. Acta*, 262 (1992) 201.
22. M. Schreurs, L. Hellendoorn, C. Gooijer, N.H. Velthorst, *J. Chromatogr.*, 552 (1991) 625.
23. M. Schreurs, C. Gooijer, N.H. Velthorst, *Anal. Chem.*, 62 (1990) 2051.
24. M. Schreurs, G.W. Somsen, C. Gooijer, N.H. Velthorst, R.W. Frei, *J. Chromatogr.*, 482 (1989) 351.
25. M. Schreurs, C. Gooijer, N.H. Velthorst, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 339 (1991) 499.
26. S. Panadero, A. Gómez-Hens, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chim. Acta*, 303 (1995) 39.
27. M.A. Fotopoulou, P.C. Ioannou, *Anal. Chim. Acta*, 462 (2002) 179.
28. A.G. Mwalupindi, I.M. Warner, *Anal. Chim. Acta*, 306 (1995) 49.

29. M. Amin, K. Harrington, R. Von Wandruska, *Anal. Chem.*, 65 (1993) 2346.
30. S. Torres-Cartas, R.M. Villanueva-Camanas, M.C. Garcia-Alvarez-Coque, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, 23 (2000) 1171.
31. M. Juhel-Gaugain, J.P. Abjean, *Chromatographia*, 47 (1998) 101.
32. Summary reports of the committee for veterinary medicinal products, The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA). EMA/MRL/104/96-FINAL. <http://www.eudra.org/emea.html>
33. Summary reports of the committee for veterinary medicinal products, The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA). EMA/MRL/707/99-FINAL. <http://www.eudra.org/emea.html>
34. Commission Regulation (EC) No 1181/2002 of 1 July 2002 amending Annex I of Council Regulation (EEC) No 2377/90 laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin, *O. J.*, L172 (2002) 13.
35. 2002/657/EC Commission Decision of 12 August 2002. Implementing Council Directive 96/23/EC Concerning the

- Performance of Analytical Methods and the Interpretation of Results, O. J., L221 (2002) 8.
36. S. Bailac, D. Barrón, V. Sanz-Nebot, J. Barbosa., J. Sep. Sci., 29 (2006) 131.
 37. B. Toussaint, M. Chedin, G. Bordin, A.R. Rodríguez, J. Chromatogr. A, 1088 (2005) 32.
 38. N. Van Hoof, K. De Wasch, L. Okerman, W. Reybroeck, S. Poelmans, H. Noppe, H. De Brabander, Anal. Chim. Acta., 529 (2005) 265.
 39. J.M. Delmas, A.M. Chapel, P. Sanders, J. Chromatogr. B, 712 (1998) 263.
 40. S.M. Plakas, K.R. el Said, F.A. Bencsath, S.M. Musser, C.C. Walker, J. AOAC Int., 82 (1998) 614.
 41. J. Guyonnet, M. Pacaud, M. Richard, A. Doisi, F. Spavone, P. Hellings, J. Chromatogr. B, 679 (1996) 177.
 42. A. Kirbis, J. Marinsek, V.C. Flajs, Biomed. Chromatogr., 19 (2005) 259.
 43. B. Roudaut, J.C. Yorke, J. Chromatogr. B, 780 (2002) 481.
 44. J.C. Yorke, P. Froc, J. Chromatogr. A, 882 (2000) 63.
 45. AOAC Peer-verified method PVM 1:1995. <http://aoac.org/>
 46. J.A. Hernández-Arteseros, J.L. Beltrán, R. Compañó, M.D. Prat, J. Chromatogr. A, 942 (2002) 275.

47. M. Ramos, A. Aranda, E. García, T. Reuvers, H. Hooghuis, J. Chromatogr. B, 789 (2003) 373.
48. R.J. Maxwell, E. Cohen, J. High Resol. Chromatogr., 21 (1998) 241.
49. C. Ho, D.W.M. Sin, H.P.O. Tang, L.P.K. Chung, S.M.P. Siu. J. Chromatogr. A, 1061 (2004) 123.
50. G. Yang, B. Lin, Z. Zeng, Z. Chen, X. Huang, J. AOAC Int., 88 (2005) 1688.
51. E. Verdon, P. Couedor, B. Roudaut, P. Sanders, J. AOAC Int., 88 (2005) 1179.
52. G.L. La Torre, M. Saitta, F. Vilasi, T. Pellicanò, G. Dugo, Food Chemistry, 94 (2006) 640.
53. C. Proestos, A. Bakogiannis, C. Psarianos, A.A. Koutinas, M. Kanellaki, M. Komaitis, Food Control, 16 (2005) 319.
54. D. Kammerer, A. Claus, R. Carle, A. Schieber, J. Agric. Food Chem., 52 (2004) 4360.
55. Z. Kerem, B. Bravdo, O. Shoseyov, Y. Tugendhaft, J. Chromatogr. A, 1052 (2004) 211.
56. M. del Álamo, L. Casado, V. Hernández, J.J. Jiménez, J. Chromatogr. A, 1049 (2004) 97.
57. R. Sladkovský, P. Solich, M. Urbánek, J. Chromatogr. A, 1040 (2004) 179.
58. R.J. Robbins, S.R. Bean, J. Chromatogr. A, 1038 (2004) 97.

59. W. Tesfaye, M.L. Morales, M.C. García-Parrilla, A.M. Troncoso, *J. Agric. Food Chem.*, 50 (2002) 7053.
60. P. Mattila, J. Kumpulainen, *J. Agric. Food Chem.*, 50 (2002) 3660.
61. F. Buiarelli, G. Cartoni, F. Coccioli, Z. Levetsovitou, *J. Chromatogr. A*, 695 (1995) 229.
62. K. de la Torre-Carbot, O. Jauregui, E. Gimeno, A.I. Castellote, R.M. Lamuela-Raventos, M.C. Lopez-Sabater, *J. Agric. Food Chem.*, 53 (2005) 4331.
63. F.A. Ayaz, S. Hayirlioglu-Ayaz, J. Gruz, O. Novak, M. Strnad, *J. Agric. Food Chem.*, 53 (2005) 8116.
64. M. Colaric, R. Veberic, A. Solar, M. Hudina, F. Stampar, *J. Agric. Food Chem.*, 53 (2005) 6390.
65. R.J. Robbins, *J. Agric. Food Chem.*, 51 (2003) 2866.
66. Y. Yilmaz, R.T. Toledo, *J. Agric. Food Chem.*, 52 (2004) 255.
67. B. Suarez, N. Palacios, N. Fraga, R. Rodríguez, *J. Chromatogr. A*, 1066 (2005) 105.
68. D. Rosch, M. Bergmann, D. Knorr, L.W. Kroh, *J. Agric. Food Chem.*, 51 (2003) 4233.
69. A Schieber, P. Keller, R Carle, *J. Chromatogr. A*, 910 (2001) 265.
70. Y. Amakura, M. Okada, S. Tsuji, Y. Tonogai, *J. Chromatogr. A*, 891 (2000) 183.

II.2. EQUIPOS Y MATERIALES

II.2.1 EQUIPOS

El sistema de detección utilizado para el desarrollo de las metodologías propuestas fue un espectrómetro de luminiscencia SLM Aminco (Urbana, IL, USA) AB2 equipado con una lámpara continua de xenón de 150 W y una lámpara pulsada de xenón de 7 W, controlado por un ordenador que suministró los datos de la intensidad de luminiscencia del sistema en estudio. Para las medidas no cromatográficas se utilizó el compartimento de muestra convencional del instrumento, donde el paso de luz de la cubeta de cuarzo es de 1 cm.

Las separaciones cromatográficas se realizaron en un cromatógrafo de líquidos modular integrado por una bomba de gradiente cuaternario de alta presión, modelo Jasco PU-2089 Plus (Jasco, Tokio, Japón), una válvula de inyección manual de alta presión, modelo 7125 Rheodyne (Cotati, CA, EEUU), dotada con un bucle de 20 μ l, y una columna Synergi Fusion-RP-80 (Phenomenex,

EEUU), 250 x 4.6 mm, con un tamaño de partícula de 4 μm , utilizada como columna analítica.

Para la derivatización post-columna se usó una bomba peristáltica de baja presión Minipuls-3, Wilson (Villiers-le-Bel, Francia) y tubos de Teflón, Omnifit (Cambridge, Reino Unido), con 0.5 mm de diámetro interno. También se utilizó una cubeta de cuarzo con un volumen interno de 18 μl modelo 176-052-QS Hellma (Hellma Hispania, Barcelona, España). Las medidas se realizaron a temperatura ambiente.

Se empleó una balanza analítica OHAUS Explorer de 110 g, que tiene una precisión de hasta 0.0001 g y con un error de ± 0.001 g, y un pHmetro Metrohm 744.

II.2.2. MATERIALES

Los reactivos usados fueron todos de grado analítico. Las disoluciones se prepararon utilizando agua desionizada y doblemente desionizada, obtenidas mediante sistemas suministrados por Millipore (Bedford; MA, EEUU).

1. Disoluciones estándares

-*Quinolonas.* Las disoluciones madre de clorhidrato de ciprofloxacina (Laboratorios Lesvi, Barcelona, España), marbofloxacina (Vetoquinol, S.A., Lure, Francia), difloxacina (Fort Dodge Veterinaria, Gerona, España), mesilato de danofloxacina (Pfizer, Amboise, Francia), enrofloxacina (Laboratorios Hipra, S.A., Gerona, España) y moxifloxacina (Química Farmacéutica Bayer, Barcelona, España) se prepararon disolviéndolos en agua destilada. Las disoluciones madre de ácido oxolínico y flumequina (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania), clorhidrato de sarafloxacina (Sigma-Aldrich, Seelze, Alemania), levofloxacina (Hoechst Marion Roussel, Madrid, España), pefloxacina (Ipsen Pharma, Barcelona, España) y norfloxacina (Sigma, St Louis, MO) se prepararon en hidróxido sódico 0.1 mol l^{-1} . Estas disoluciones se guardaron a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ y fueron estables durante un mes.

-*Compuestos fenólicos.* Los ácidos gálico, protocatecuico, vanilílico y p-hidroxibenzoico, catequina y epicatequina fueron suministrados por Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania). El ácido siríngico se adquirió a Fluka (Fluka, Buchs, Suiza) y el ácido salicílico fue proporcionado por Aldrich (Aldrich, Gillingham, Dorset, Reino Unido). Las disoluciones madre de estos

analitos se prepararon en metanol y se almacenaron a 4 °C protegidas de la luz. En estas condiciones, fueron estables durante 15 días. Para todos los sistemas estudiados, las disoluciones de trabajo de los analitos se prepararon diariamente en agua destilada.

En los métodos directos, para preparar la disolución de terbio(III) se disolvió la cantidad apropiada de nitrato de terbio(III) pentahidratado (Aldrich, Gillingham, Dorset, Reino Unido) y se utilizó una disolución de dodecilsulfato sódico (SDS) (Aldrich, Gillingham, Dorset, Reino Unido) en agua destilada.

2. Disoluciones reguladoras

Se utilizaron disoluciones de Tris(hidroximetilamino)metano (Tris) (Aldrich, Gillingham, Dorset, Reino Unido) y de acetato de amonio (Merck, Darmstadt, Alemania).

3. Reactivos derivatizantes

-*Quinolonas*. Se preparó una disolución de terbio(III) disolviendo la cantidad apropiada de nitrato de terbio(III) pentahidratado en una disolución reguladora de HAc/NH₄Ac (Merck, Darmstadt, Alemania) como disolución derivatizante.

-*Compuestos fenólicos*. La disolución del reactivo derivatizante se preparó disolviendo la cantidad apropiada de nitrato de terbio(III) pentahidratado en una disolución que contenía hidróxido sódico y AEDT (Merck, Darmstadt, Alemania).

4. Fases móviles

-*Quinolonas*. La fase móvil utilizada contenía una disolución de ácido acético (Merck, Darmstadt, Alemania) (0.2%; pH 3.0) y acetonitrilo (HPLC-grade, Panreac Quimica S.A., Barcelona, España).

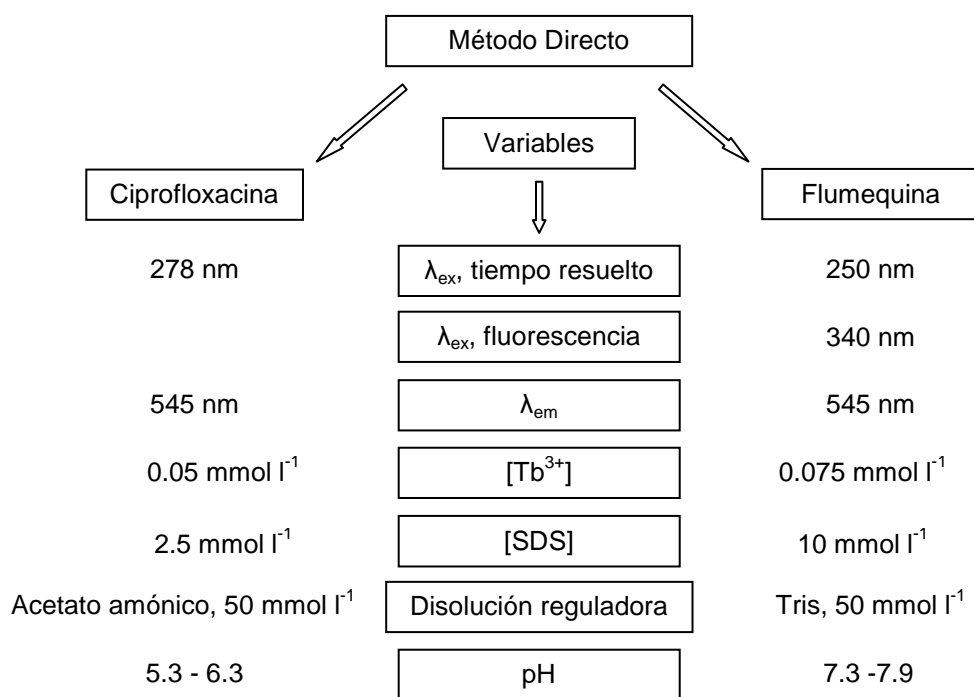
-*Compuestos fenólicos*. La fase móvil se obtuvo mediante la mezcla de dos disolventes, el disolvente A que contenía metanol:ácido acético (10:90) (0.2%; pH 3.0) y el disolvente B metanol:ácido acético (90:10) (0.2%; pH 3.4).

II.3. PROCEDIMIENTOS

II.3.1. DETERMINACIÓN DIRECTA DE QUINOLONAS

Las disoluciones que contienen ciprofloxacina o flumequina con los reactivos correspondientes en cada caso se preparan en

matraces de 10 ml. El esquema siguiente resume las concentraciones de los reactivos utilizados para cada uno de los métodos propuestos.



Cada estándar o muestra se ensaya por triplicado y se resta la señal del blanco para cada medida.

II.3.2. DETERMINACIÓN DE CIPROFLOXACINA EN MUESTRAS DE LECHE

Se mezcla 1.0 g de leche con 2 ml de acetonitrilo y la suspensión formada se centrifuga a 2000 rpm durante 10 minutos. Se toman 300 µl de sobrenadante y se tratan según el procedimiento esquematizado anteriormente para la determinación de ciprofloxacina.

II.3.3. DETERMINACIÓN DE QUINOLONAS MEDIANTE CROMATOGRFÍA LÍQUIDA CON DETECCIÓN LUMINISCENTE

La determinación se realiza mediante LC en fase invertida, utilizando una columna de C₁₈ como fase estacionaria. Los analitos se introducen en la columna mediante una válvula de inyección dotada con un bucle de 20 µl. El eluido de la columna se hace confluir con la disolución de reactivo derivatizante que se impulsa mediante una bomba peristáltica de baja presión.

En la siguiente tabla se resumen las condiciones experimentales utilizadas.

Variables		Mezcla de Quinolonas	Flumequina
Cromatografía líquida			
	Velocidad de flujo, ml min ⁻¹		1.0
	Composición fase móvil	A HAc (30 mmol l ⁻¹ , pH 3.0)	
		B Acetonitrilo	
	Programa	Gradiente	Isocrático
Derivatización post-columna			
	Velocidad de flujo, ml min ⁻¹		0.6
	Longitud del reactor L ₁ , cm		50
	Tb ⁺³ , mmol l ⁻¹	10	9 - 13
	HAc/NH ₄ Ac, mol l ⁻¹	0.5	0.1
	pH	6.0	6.3 – 7.3
Detección luminiscente			
	λ _{ex} nm, tiempo resuelto	281	250
	λ _{ex} nm, fluorescencia		340
	λ _{em} nm		545

Cada medida se realiza por triplicado y se resta la señal del blanco.

II.3.4. DETERMINACIÓN DE QUINOLONAS EN MUESTRAS DE ALIMENTOS

A las muestras de tejido y de leche se les añadieron las cantidades necesarias de cada analito, utilizando el mínimo volumen posible. Las muestras se almacenan durante 24 horas a 4 °C, con el fin de permitir la equilibración de cada antibiótico en la matriz de la muestra y se analizan según los procedimientos siguientes:

Muestras de hígado y músculo de pollo: 1.0 g de hígado ó 2.0 g de músculo se agitan con 4 ml de acetonitrilo durante 10 minutos. La suspensión se centrifuga a 3000 rpm durante 15 minutos, la fase orgánica extraída se ajusta a un pH aparente de 4.0 y se usa para la determinación del analito en el método de LC anteriormente mencionado.

Muestras de leche: 1.0 g de leche se trata con 1.0 ml de una disolución al 20% de ácido tricloroacético en metanol y se agita durante un minuto. La suspensión se trata como se ha descrito anteriormente para las muestras de tejido.

II.3.5. DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CON DETECCIÓN LUMINISCENTE

El montaje instrumental es idéntico al utilizado para la determinación de fluoroquinolonas descrito en el apartado II.3.3. La siguiente tabla resume las condiciones experimentales utilizadas.

Cromatografía líquida	Velocidad de flujo, ml min ⁻¹	0.8
	Composición fase móvil	A metanol:ácido acético (10:90) (0.2%; pH 3.0) B metanol:ácido acético (90:10) (0.2%; pH 3.4)
	Programa	Gradiente
Derivatización post-columna	Caudal (ml min ⁻¹)	0.46
	Longitud del reactor L ₁ , cm	50
	Tb ⁺³ , mmol l ⁻¹	10
	AEDT, mmol l ⁻¹	30
	NaOH, mmol l ⁻¹	14
Detección fluorescente		
	λ _{ex} nm	295
	λ _{em} nm	545

II.3.6. DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN MUESTRAS DE VINO

1.0 ml de vino se diluye con 1.0 ml de agua destilada, se agita para homogenizar y se inyecta directamente en el sistema cromatográfico. La señal del blanco se resta para cada medida.

**II.4. SENSITIVE DETERMINATION OF FLUOROQUINOLONE
ANTIBIOTICS IN MILK SAMPLES USING TIME-RESOLVED
METHODOLOGY**

Trabajo publicado en la revista "ANALYTICAL LETTERS"
(2004, 37, 1163-1175).

Nuevas estrategias metodológicas mediante iones lantánidos aplicables al análisis de rutina

**SENSITIVE DETERMINATION OF FLUOROQUINOLONE
ANTIBIOTICS IN MILK SAMPLES USING TIME-RESOLVED
METHODOLOGY**

*R. C. Rodríguez-Díaz, M. P. Aguilar-Caballos and A. Gómez-Hens**
*Department of Analytical Chemistry, University of Córdoba, Anexo C-3,
Campus of Rabanales, E-14071 Córdoba, Spain*

ABSTRACT

The potential application of terbium(III) as a general reagent for the luminescent determination of fluoroquinolone residues in milk samples is studied. Ten fluoroquinolones with different functional groups have been chosen for this purpose. Using time-resolved methodology and 278 and 545 nm as excitation and emission wavelengths, most of the fluoroquinolones assayed give intense luminescence in the presence of terbium(III), which can be useful for screening purposes. Ciprofloxacin, which is the major metabolite of enrofloxacin, one of the fluoroquinolones used in veterinary medicine, has been taken as fluoroquinolone model for the optimization of the method, which has been developed in the presence of the anionic surfactant sodium dodecylsulfate, which

Nuevas estrategias metodológicas mediante iones lantánidos aplicables al análisis de rutina

protects the chelate from non-radiative processes. The dynamic range of the calibration graph was 0.5-1000 ng ml⁻¹ and the calculated detection limit was 0.14 ng ml⁻¹. Similar results were obtained for most of the other fluoroquinolones assayed. The precision, expressed as relative standard deviation, was lower than 5 %. The method is very fast and only requires the simple deproteinization of milk samples with acetonitrile, obtaining analytical recoveries that ranged from 91.9 to 110.5 %.

Keywords: fluoroquinolones; time-resolved luminescence; terbium(III); milk samples

1. INTRODUCTION

There is a great interest to control the presence of antibiotic residues in food derived from animals, such as milk, because they can bring about the growth of antibiotic-resistant bacteria and, also, they can cause allergic responses. This is a potential hazard for the consumers of the contaminated food and, for this reason, some antibiotics are used only in human medicine. Among these compounds, fluoroquinolones are widely applied in the treatment and prevention of veterinary diseases and their residues may persist in milk. Thus, the need to control the presence of these antibiotics is obvious.

Fluoroquinolones are a group of broad spectrum antibiotics. They have good activity against most enterobacteriae and facultative anaerobic bacteria; in addition, they are effective against many bacterial strains that are multiresistant to β -lactams and aminoglycoside antibiotics (1). They develop their pharmacological action via a specific inhibition of subunit-A of the bacterial topoisomerase DNA gyrase, which controls the shape of DNA. There are four fluoroquinolones, namely enrofloxacin, marbofloxacin, flumequine and danofloxacin, that are approved by the European Union legislation to be used in animals from which milk is produced

for human consumption, being the maximum residue limits (MLRs) 100, 75, 50 and 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectively (2). In the case of enrofloxacin, which is used in the treatment of bovine respiratory disease, it is excreted in milk after deethylation as ciprofloxacin (3). This is also an active antibiotic but its use is only intended to humans. In fact, it is one of the most used clinical antibiotics in the world. The MLR above given for enrofloxacin corresponds to the sum of both antibiotics.

Photoluminescence spectroscopy is frequently used for fluoroquinolone determination based on their native fluorescence or using a derivatization reaction. In this instance, several methods have been described with terbium(III) as reagent (4-13), which forms strong luminescent chelates through the carboxylic and keto oxygens of the fluoroquinolone molecule. The luminescence of these systems arises from an intramolecular energy transfer process from the excited triplet state of the analyte to the emitting level of the lanthanide ion and the intensity depends on the substituent attached to the nitrogen atom of the pyridone ring. The relatively long-lived luminescence of these chelates allows the time-resolved methodology to be used, which avoids potential spectral interferences from scatter, Raman and any fluorescence background signal, as they have much shorter lifetimes. Also, this methodology

enhances the analytical signal as this is integrated during a longer time than in the fluorescence mode. Moreover, these chelates show a large Stokes shift and narrow and intense emission bands, which contribute to avoid or minimize selectivity limitations of photoluminescence. These methods have been applied to the analysis of pharmaceutical, clinical and animal tissue samples, but the analytical usefulness of terbium(III) to the control of fluoroquinolones in milk samples has not been described up to date. Also, there is not information about the comparative luminescent behavior of different fluoroquinolones in the presence of terbium(III), which would be useful to know the potential general use of this lanthanide ion for screening purposes or as a derivatizing reagent in liquid chromatography. This paper shows a systematic study of the behavior of ten fluoroquinolones, which have been chosen taking into account their different structure and their potential presence in milk samples.

Liquid chromatography has been widely applied to the determination of fluoroquinolones in milk samples by using photometry (3,14), fluorimetry (15,16) and mass spectroscopy (17,18) as detection systems. In general, low detection limits are obtained but recoveries were relatively low in some instances (14-17), obtaining values of 65-85%. These values could be ascribed to

the sample pretreatment that involves the use of solid-phase extraction (14,16), immunoaffinity (15) or a complex treatment (17) with several extraction steps and an evaporation to dryness, which should be avoided in trace analysis, taking into account the low concentration levels of fluoroquinolones in milk samples. The present work describes a simple and fast pretreatment of these samples involving only a deproteinization step with acetonitrile (3), which allows recoveries close to 100% to be obtained. Ciprofloxacin has been taken as fluoroquinolone model because it can be present in milk samples as metabolite of enrofloxacin.

2. EXPERIMENTAL

2.1. *Instrumentation*

A SLM Aminco (Urbana, IL, USA) AB2 luminescence spectrometer equipped with a 150 W continuous xenon lamp and a 7 W pulsed xenon lamp was used. The path length of quartz cuvette was 1 cm. Excitation and emission slits were set to provide 8 and 16-nm band-pass, respectively. Luminescence measurements were performed at room temperature. The time resolved mode of the instrument was used.

2.2. Reagents

All reagents used were of analytical grade. Stock solutions (400 $\mu\text{g ml}^{-1}$) of ciprofloxacin hydrochloride (Lesvi Laboratories, Barcelona, Spain), danofloxacin mesylate (Pfizer, Amboise, France), marbofloxacin (Vetoquinol, Lure, France) and moxifloxacin (Química Farmacéutica Bayer, Barcelona, Spain) were prepared in distilled water and those of difloxacin (Fort Dodge Veterinaria, Girona, Spain), flumequine and norfloxacin (Sigma, St Louis, MO, USA), levofloxacin (Hoechst Marion Roussel, Madrid, Spain), enrofloxacin (Química Farmacéutica Bayer, Barcelona, Spain) and pefloxacin (Ipsen Pharma, Barcelona, Spain) in 0.1 M sodium hydroxide. These solutions were stored at 4 °C and further dilutions in distilled water were used as working solutions. A 10^{-3} M solution of terbium(III) was prepared by dissolving the appropriate amount of terbium(III) nitrate pentahydrate (Aldrich, Gillingham, Dorset, UK) in distilled water. Aqueous solutions of ammonium acetate buffer (0.5 M, pH 5.7) (Merck, Darmstad, Germany) and sodium dodecylsulfate (SDS) (1×10^{-2} M) (Aldrich, Gillingham, Dorset, UK) were also prepared.

2.3. Procedures

2.3.1. Determination of ciprofloxacin

Solutions containing ciprofloxacin ($0.5\text{--}1000\text{ ng ml}^{-1}$), terbium(III) ($5 \times 10^{-5}\text{ M}$), SDS ($2.5 \times 10^{-3}\text{ M}$) and sodium acetate buffer (0.05 M) were prepared in a 10 ml volumetric flask. The luminescence intensity was measured at $\lambda_{\text{ex}} 278$ and $\lambda_{\text{em}} 545$ nm. The time resolved mode of the instrument was used, with 0.03 and 2 ms as delay and gate times, respectively. The cycle time used was 10 ms. Each standard or sample was assayed in triplicate. The blank signal was subtracted from each measurement.

2.3.2. Determination of ciprofloxacin in milk samples

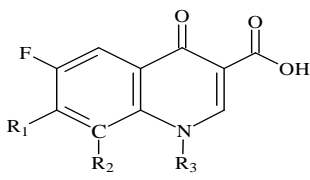
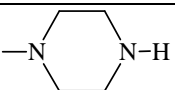
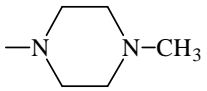
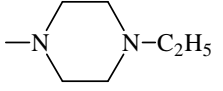

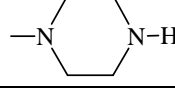

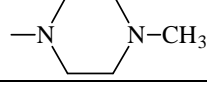
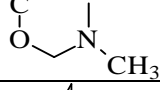
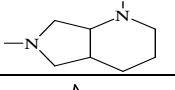

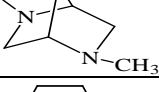

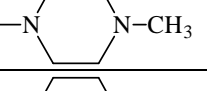
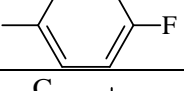
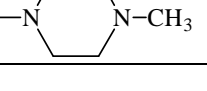
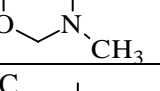
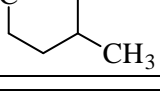
1.0 g of milk sample was mixed to 2.0 ml of acetonitrile and the suspension formed was centrifuged at 2000 rpm for 10 min. 300 μl of the supernatant were taken and treated as in the above mentioned procedure for the determination of ciprofloxacin.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Study of the Luminescent Behavior of Quinolones

With the aim of obtaining information about the potential general use of terbium(III) as reagent for fluoroquinolone detection, ten of these compounds were assayed (Table 1).

Table 1. Chemical structure of the fluoroquinolones studied

			
	Substituent groups		
Fluoroquinolone	R1	R2	R3
Norfloxacin		-H	-C ₂ H ₅
Pefloxacin		-H	-CH ₃
Enrofloxacin		-H	
Ciprofloxacin		-H	
Levofloxacin		-R ₃	
Moxifloxacin		-OCH ₃	
Danofloxacin		-H	
Difloxacin		-H	
Marbofloxacin		-R ₃	
Flumequine	-H	-R ₃ *	

They were chosen taking into account the different functional groups present in their structure and, also, their potential presence in milk samples. Most of the excitation spectra obtained for the Tb(III)-fluoroquinolone systems assayed, using the time-resolved mode of the instrument, showed a wide band with maximum intensity at about 278 nm (Figure 1). Levofloxacin and marbofloxacin showed maximum excitation at 292 nm and flumequine at 325 nm.

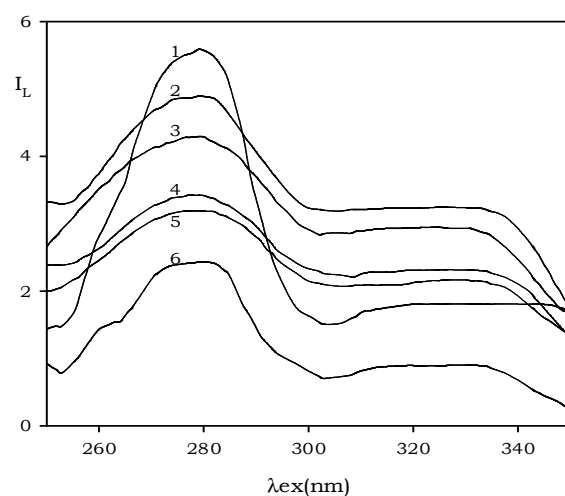


Figure 1. Excitation spectra (λ_{em} 545 nm) obtained for danofloxacin (1), norfloxacin (2), pefloxacin (3), ciprofloxacin (4), enrofloxacin (5) and difloxacin (6) in the presence of terbium(III). Experimental conditions: [fluoroquinolone] = 15 ng ml⁻¹; [terbium(III)] = 5 x 10⁻⁵ M; [NaCH₃COO] = 50 mM, pH 5.7

The emission spectra of these systems showed the four characteristic peaks of terbium emission at 490, 545, 585 and 621 nm, which correspond to $^5D_4 \rightarrow ^7F_6$, $^5D_4 \rightarrow ^7F_5$, $^5D_4 \rightarrow ^7F_4$ and $^5D_4 \rightarrow ^7F_3$ transitions, respectively, being the most intense band at 545 nm. The time-resolved mode allows the elimination of scattering problems originated from the excitation at 278 nm and, also, avoids background fluorescent signals from the sample matrix. In the case of moxifloxacin, no fluorescent signal was obtained under the experimental conditions, which can be ascribed to the presence in the molecule of saturated groups attached to the carbon close to the fluoride atom. Fluoroquinolones exhibiting highest luminescent signals at 278 and 545 nm as excitation and emission wavelengths were danofloxacin, norfloxacin and pefloxacin, followed by ciprofloxacin and enrofloxacin, which show a very similar luminescence behavior.

Some of these systems (5,6) have been studied in the presence of a synergetic ligand, usually trioctylphosphine (TOPO), which acts by removing water molecules and completing the coordination sphere of the lanthanide ion, finding a positive effect on the luminescence intensity when terbium(III) concentration was in the range 10^{-3} - 3×10^{-3} M. However, this effect was not observed in the systems studied by us, assaying a TOPO concentration range of 10^{-5}

10^{-4} M in the presence of a 5×10^{-5} M Tb(III) concentration. Also, with the aim of studying the potential formation of other ternary complexes, tenoyltrifluoroacetone (TTA) and EDTA were assayed in a concentration range of 1.5×10^{-8} - 2.5×10^{-5} M and 10^{-5} - 10^{-4} M, respectively. TTA notably decreased the luminescence while EDTA did not cause any effect.

Surfactants are also frequently used to improve the luminescence of Tb(III)-fluoroquinolone systems (8,9,12) because organized media can protect them from non-radiative processes. We have assayed Triton X-100, cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) and sodium dodecylsulfate (SDS), as models of non-ionic, cationic and anionic surfactants, at concentrations below and above their critical micellar concentrations. Triton X-100 and CTAB only caused a slight increase in the luminescence intensity while SDS notably improved it.

3.2. Optimization of Variables

Variables affecting the fluoroquinolone systems studied were optimized by altering each variable in turn while all others remained constant. Each result was the average of three measurements. Values chosen were those yielding the maximum luminescence

signal and minimum standard deviation. Most of the assays were carried out by using ciprofloxacin as fluoroquinolone model.

The effect of the pH on the system was studied in the range 4.0-9.0, by using hydrochloric acid or sodium hydroxide solution to adjust the pH. The optimum pH range was 5.3-6.3, obtaining a sharp decrease in the luminescence signal at lower or higher pH values. Triethanolamine and sodium acetate buffer solutions were assayed to adjust the optimum pH. The former caused a negative effect on the luminescence signal but this was independent of sodium acetate buffer solution concentration in the range 0.02-0.08 M, being chosen 0.05 M as optimum. Several assays were carried out to optimize the Tb(III) and SDS concentration. Although some methods for fluoroquinolone determination (8,9,12) have been developed in the presence of a relatively high terbium(III) (10^{-3} - 3×10^{-3} M) and SDS (10^{-2} M) concentrations, we have obtained similar results decreasing the concentration of both reagents to 5×10^{-5} M and 2.5×10^{-3} M, respectively. This SDS concentration is close to its critical micellar concentration (8) under our experimental conditions of ionic strength. The delay and gate times were assayed in the range 0.03-0.2 ms and 1-5 ms, respectively. The values chosen were 0.03 ms and 2 ms, respectively.

3.3. Analytical Features

The dynamic range of the calibration graph obtained for ciprofloxacin under optimum conditions and using the time-resolved mode was 0.5-1000 ng ml⁻¹, which required two different instrumental sensitivities. Table 2 shows the features of each stretch of the calibration graph, where can be seen that the Pearson's correlation coefficients obtained suggest a good linearity of the regression. The detection limit calculated according to IUPAC recommendations (19) was 0.14 ng ml⁻¹.

Table 2. Quantitative performance of the proposed method

Linear range (ng ml ⁻¹)	Slope ± SD (ng ⁻¹ ml)	Intercept ± SD	r
0.5-40	0.234 ± 0.009	0.03 ± 0.01	0.998
40-1000	(9.2 ± 0.3) × 10 ⁻³	0.12 ± 0.09	0.993

This analytical parameter was also calculated by the same procedure using fluorescence measurements instead of time-resolved measurements, obtaining a value of 1 ng ml⁻¹. These different values can be explained by the relatively long lifetime of the

terbium-ciprofloxacin complex, which was calculated to be 0.37 ms, so that the time-resolved mode allows the signal to be integrated longer. The quantification limits (LOQs) for the different fluoroquinolones above indicated were obtained under the optimum conditions selected for ciprofloxacin. Table 3 shows the results obtained, where can be seen that danofloxacin, norfloxacin, enrofloxacin, pefloxacin and difloxacin give similar LOQs to that obtained for ciprofloxacin. The higher values obtained for flumequine, marbofloxacin and levofloxacin can be in part ascribed to the fact that their optimum excitation wavelength is higher than 278 nm.

Table 3. LOQs obtained for several of the studied fluoroquinolones

Fluoroquinolone	LOQ/(ng ml ⁻¹)
Danofloxacin	0.29
Norfloxacin	0.36
Pefloxacin	0.41
Ciprofloxacin	0.5
Enrofloxacin	0.55
Difloxacin	0.73
Flumequine	2.11
Marbofloxacin	16.2
Levofloxacin	117

As the aim of this study was to know the capability of terbium(III) as a general reagent for fluoroquinolone detection in the screening of milk samples, several assays were carried out to study the effect of the sample matrix. The results obtained showed that the slopes of the calibration graphs and the LOQs obtained in the presence of a 1% deproteinized milk were the same than those obtained in the absence of the milk sample. A higher sample concentration caused an increase in the blank signal, which have a negative effect on the LOQ. However, although a dilution factor of 100 is required, the low values obtained for this analytical parameter allow the method to be applied to the determination of ciprofloxacin, enrofloxacin and danofloxacin at lower concentration levels than their corresponding MLRs in milk, but they do not reach those for flumequine and marbofloxacin in milk. The detection of these compounds requires a change in the experimental conditions, such as the excitation wavelength. The similar LOQs and dynamic ranges of the calibration graph obtained for ciprofloxacin and enrofloxacin allows the application of the method to the determination of the sum of both fluoroquinolones in milk by using the calibration graph obtained for ciprofloxacin or enrofloxacin. The method also allows the presence of very low levels of norfloxacin, difloxacin and pefloxacin to be detected, although these fluoroquinolones are not allowed in milk.

The precision of the method, expressed as the percentage of relative standard deviation was evaluated at two different ciprofloxacin concentrations, 10 ng ml⁻¹ and 500 ng ml⁻¹, with values ranging from 3.9-5%. The selectivity was investigated by assaying other antibacterial agents as potential interferent species. Table 4 shows the maximum tolerated concentration for each compound. A substance was considered not to interfere at a given concentration if the luminescence intensity obtained in its presence was within one standard deviation of the value obtained with the analyte alone.

Table 4. Influence of foreign substances over the determination of 0.3 µg ml⁻¹ of ciprofloxacin

Compound	Maximum tolerated concentration/µg ml ⁻¹
Vancomycin	20
Neomycin sulphate	15
Gentamycin sulphate	15
Tylosin tartrate	5
Demeclocycline	3
Chlortetracycline	3
Oxytetracycline	3
Doxycycline	3
Salicylate	10

All the non-structurally related assayed species were tolerated at higher concentrations than that of ciprofloxacin. The effect of salicylate on the system has been also studied, because it has been described (6) that this species interferes on the determination of ciprofloxacin, at a concentration 30-times lower than that of the analyte, by using Tb(III), TOPO and the fluorescence mode. However, a maximum salicylate/ciprofloxacin tolerated ratio of 33 has been obtained under our experimental conditions, which could be ascribed to the temporal discrimination of the time-resolved mode as the lifetime of the Tb(III)-salicylate complex is shorter than that of the Tb(III)-ciprofloxacin complex.

3.4. Applications

Ciprofloxacin was taken as a model to apply the proposed method to the analysis of four different milk samples: raw, whole, semi-skimmed and skimmed milk. A simple deproteinization procedure with acetonitrile was only required for the analysis of the samples. The analyte concentration was calculated by interpolating in the calibration curve, as the slope of the calibration curve did not change in the presence of a 1% of sample matrix. None of the samples assayed gave a positive result for the fluoroquinolone. Recoveries were obtained by adding three different amounts of

ciprofloxacin to each sample. As can be seen from Table 5, recoveries ranged between 91.9 and 110.5%.

Table 5. Recoveries of the ciprofloxacin added to milk samples

Sample	Added/ ^a	Found/ ^{a,b}	Recovery (%)
Whole milk	0.07	0.072 ± 0.002	102.6
	0.1	0.092 ± 0.003	91.9
	0.3	0.29 ± 0.01	97.3
Raw milk	0.07	0.077 ± 0.003	110.5
	0.1	0.10 ± 0.01	99.7
	0.3	0.301 ± 0.006	100.4
Semi-skimmed milk	0.07	0.07 ± 0.004	100.2
	0.1	0.101 ± 0.002	100.6
	0.3	0.30 ± 0.01	100.7
Skimmed milk	0.07	0.072 ± 0.001	102.8
	0.1	0.098 ± 0.003	98
	0.3	0.29 ± 0.01	98.1

^aUnits: mg kg⁻¹

^bEach result was the mean of three measurement

Although a relatively high sample dilution is required, the recoveries obtained were notably better than those obtained after several extraction and evaporation steps (8,9) described for the determination of ciprofloxacin in biological tissues, which ranged between 47.4 and 61.9%. Also, as indicated above, the recoveries obtained improve those given in some chromatographic methods for fluoroquinolone determination in milk (14-17).

4. CONCLUSIONS

The results obtained in this study show the applicability of time-resolved luminescence involving terbium(III) as reagent for the determination of fluoroquinolones in milk samples. An outstanding feature of the proposed method is that the similar luminescence behavior of enrofloxacin and ciprofloxacin allows the determination in milk of the sum of both antibiotics at concentration levels lower than the MLR. Although the method does not distinguish between different fluoroquinolones, it can be used for screening purposes in milk samples as the determination is very simple and fast and is not interfered from other antibiotic classes such as glycopeptides, aminoglycosides or tetracyclines. Also, the temporal discrimination of the analytical signal given by the time-resolved methodology avoids the background signal from the sample matrix and the interference of

salicylates. When fluoroquinolone identification in milk samples would be required, the use of terbium(III) as a derivatizing reagent in liquid chromatography could be an interesting option, taking into account the good sensitivity of the method.

ACKNOWLEDGMENT

The authors gratefully acknowledge financial support from the Spanish DGICYT (Dirección General de Investigación del Ministerio de Ciencia y Tecnología) Grant no. BQU2000-0905.

REFERENCES

1. Schaeffer A. The expanding role of fluoroquinolones. *Am. J. Med.* **2002**, 113(1A), 45S-54S.
2. European Commission, Regulation 99/508/EEC, 9 March, *Off. J. Eur. Commun.* **1999**, L60, 305.
3. Tyczkowska, K.L.; Voyksner, R.D.; Anderson, K.L.; Papich, M.G. Simultaneous determination of enrofloxacin and its primary metabolite ciprofloxacin in bovine milk and plasma by ion-pairing

- chromatography. *J. Chromatogr. B, Biomed. Appl.* **1994**, 658(2), 341-348.
4. Gómez-Hens, A.; Aguilar-Caballos, M.P. Terbium-sensitized luminescence: a selective and versatile analytical approach. *Trends Anal. Chem.* **2002**, 21(2), 131-141.
 5. Rieutord, A.; Vazquez, L.; Soursac, M.; Prognon, P.; Blais, J.; Bourget, P.; Mahuzier, G. Fluoroquinolones as sensitizers of lanthanide fluorescence: application to the liquid-chromatographic determination of ciprofloxacin using terbium. *Anal. Chim. Acta* **1994**, 290(1), 215-225.
 6. Veiopoulou, C.J.; Ioannou, P.C.; Lianidou, E.S. Application of terbium-sensitized fluorescence for the determination of the fluoroquinolone antibiotics pefloxacin, ciprofloxacin and norfloxacin in serum. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1997**, 15(12), 1839-1844.
 7. Panadero, S.; Gómez-Hens, A.; Pérez-Bendito, D. Stopped flow kinetic determination of nalidixic acid and norfloxacin based on lanthanide-sensitized fluorescence. *Anal. Chim. Acta* **1995**, 303(1), 39-45.
 8. Hernández-Arteseros, J.A.; Compañó, R.; Prat, M.D. Determination of ciprofloxacin and enrofloxacin in edible animal tissues by terbium-sensitized luminescence. *Analyst* **1998**, 123(12), 2729-2732.

9. Hernández-Arteseros, J.A.; Compañó, R.; Ferrer, R.; Prat, M.D. Application of principal component regression to luminescence data for the screening of ciprofloxacin and enrofloxacin in animal tissues. *Analyst* **2000**, 125(6), 1155-1158.
10. Zhang, T.L.; Zhao, H.C.; Jin, I.P. Photochemical fluorescence enhancement of the terbium–lomefloxacin complex and its application. *Talanta* **1999**, 49(1), 77-82.
11. You, F.; Jin, L.; Zhao, H. Study on fluorescence of the terbium(III)-enoxacin system and the determination of enoxacin. *Anal. Commun.* **1999**, 36(6), 231-233.
12. Ocaña, J.A.; Callejón, M., Barragán, F.J. Terbium-sensitised luminescence determination of levofloxacin in tablets and human urine and serum. *Analyst* **2000**, 125(10), 1851-1854.
13. Huang, Z.Y.; Cai, R.X.; Zhang, K.; Huang, H.P.; Zeng, Y.N. Micelle enhanced spectrofluorimetric determination of norfloxacin using terbium as fluorescent probe. *Anal. Lett.* **1997**, 30(8), 1531-1539.
14. Cinquina, A.L.; Roberti, P.; Giannetti, L.; Longo, F.; Draisci, R.; Fagiolo, A.; Brizioli, N.R. Determination of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in goat milk by high-performance liquid chromatography with diode-array detection. Optimization and validation. *J. Chromatogr. A* **2003**, 987(1-2), 221-226.

15. Holtzapple, C.K.; Buckley, S.A.; Stanker, L.H. Determination of four fluoroquinolones in milk by on-line immunoaffinity capture coupled with reversed-phase liquid chromatography. *J. AOAC Int.* **1999**, 82(3), 607-613.
16. Roybal, J.E.; Pfenning, A.P.; Turnipseed, S.B.; Walker, C.C.; Hurlbut, J.A. Determination of four fluoroquinolones in milk by liquid chromatography. *J. AOAC Int.* **1997**, 80(5), 982-987.
17. Volmer, D.A.; Mansoori, B.; Locke, S.J. Study of 4-quinolone antibiotics in biological samples by short-column liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* **1997**, 69(20), 4143-4155.
18. Kennedy, D.G.; McCracken, R.J.; Cannavan, A.; Hewitt, S.A. Use of liquid-chromatography-mass spectrometry in the analysis of residues of antibiotics in meat and milk. *J. Chromatogr. A* **1998**, 812(1-2), 77-98.
19. Long, G.L.; Winefordner, J.D. Limit of detection. A closer look at the IUPAC definition. *Anal. Chem.* **1983**, 55(7), 712A-714A.

**II.5. CHROMATOGRAPHIC DETERMINATION OF FLUMEQUINE
IN FOOD SAMPLES BY POST-COLUMN DERIVATISATION
WITH TERBIUM(III)**

Trabajo enviado a la revista "Analytica Chimica Acta".

Nuevas estrategias metodológicas mediante iones lantánidos aplicables al análisis de rutina

**CHROMATOGRAPHIC DETERMINATION OF FLUMEQUINE IN
FOOD SAMPLES BY POST-COLUMN DERIVATISATION WITH
TERBIUM (III)**

*R. C. Rodríguez-Díaz, J. M. Fernández-Romero, M. P.
Aguilar-Caballos and A. Gómez-Hens**

*Department of Analytical Chemistry. "Marie Curie Annex" building. Campus
of Rabanales. University of Córdoba, E-14071 Córdoba, Spain*

ABSTRACT

The potential usefulness of terbium(III) as reagent for the luminescent determination of flumequine residues in food samples has been studied using both fluorescence (FL) and time-resolved (TR) modes and both batch (B) and integrated liquid chromatography (LC)/derivatisation approaches. The system was optimised in each instance to establish the analytical features of the four methods. The dynamic ranges of the calibration graphs and the detection limits, obtained with standard solutions of flumequine, were (ng ml^{-1}): B-FL 0.18-600, 0.055; B-TR 2.4-150, 0.7; LC-FL 3.7-1000, 1.1 and LC-TR 52-3000, 15. The precision, expressed as the percentage of relative standard deviation, was equal or lower than 5.1% in all instances.

Nuevas estrategias metodológicas mediante iones lantánidos aplicables al análisis de rutina

The LC methods, which avoid the interference of other quinolone antibiotics, were applied to the analysis of chicken muscle and liver, and whole milk samples. The sample pre-treatment only consisted of a deproteinisation step. The validation procedure for the analysis of samples was carried out using EC recommendations, and the decision limit and detection capability were calculated. The recoveries obtained ranged from 95.0% to 103.8%.

Keywords: Flumequine; Terbium(III), Fluorescence and time-resolved detection, Liquid chromatography, Food samples.

1. INTRODUCTION

There is a great interest to control the presence of antibiotic residues in foods derived from animals because they can bring about the growth of antibiotic-resistant bacteria and, also, they can cause allergic responses [1,2]. These effects are a potential hazard for consumers of contaminated foods and, for this reason, some antibiotics must be restricted to human therapy. Recently, several restrictions in the development of new veterinary drugs have been imposed by FAO [3], so that, pharmaceutical companies have to demonstrate that drug release residues in the edible tissues of treated animals constitute no-potential risks for the human consumption. Thus, the control of the presence of antibiotics residues is needed in animals susceptible to produce foods and foodstuffs. The procedure for the performance of analytical methods used for residue determination and the interpretation of the results obtained has been recently revised in the European Union (EU) legislation [4].

Among antibiotics, fluoroquinolones are widely used in veterinary therapies and their residues may persist in foods. Flumequine is a first-generation fluoroquinolone used in mammalian, poultry and salmonidae species for the treatment and prevention of

Enterobacterious diseases. It can be administered by oral or parenteral (intramuscular or subcutaneous) routes. Metabolism studies have demonstrated that flumequine can be excreted in unchanged form and as its 7-hydroxy- and glucuronide- metabolites. The proportion of these metabolites can be different upon the tissue and the animal species evaluated [5,6]. In general, it has been found that the unchanged drug represents the main microbiologically active compound in most tissues and it has been settled up as the marker residue. Maximum residue limits (MRLs) [7] given by EU legislation for flumequine are based on this consideration.

Microbiological assays based on the inhibition in the activity of different bacteria [8,9], have been developed for the determination of several antibiotics, including flumequine, in milk samples. The use of an electrochemical sensor [9] afforded the detection of flumequine below 25 ng ml⁻¹. Some methods based on solid phase extraction (SPE) together with liquid chromatography (LC) coupled to mass spectrometry [10] or to tandem mass spectrometry [11,12] have been reported for the simultaneous determination of flumequine and other quinolones. Nevertheless, the fluorescent properties of this antibiotic have been widely exploited for the development of LC methods with fluorimetric detection [13-25]. Some of these methods allow the determination of flumequine and its 7-hydroxy- metabolite in plasma

[13,14] as well as in muscle [14] and kidney tissues [15]. More recently, as flumequine itself is the marker residue, the individual determination of flumequine [16] or the simultaneous determination of flumequine together with other quinolones from an antibiotic mixture have been reported [17-24]. The sample pre-treatment in these approaches consisted of the use of successive solvent extraction steps of the quinolone from tissue or milk and then, solvent evaporation [16-19], or a SPE step after extraction of the analytes into an organic solvent [21,23,24]. These steps are often required in order to minimise or avoid interferences from sample matrix and also to attain the required sensitivity for sample analysis, in special for milk samples, for which the MRLs are relatively low ($50 \mu\text{g kg}^{-1}$ for flumequine) [7].

Terbium(III) has been widely described as reagent for the determination of several quinolones, which form luminescent chelates that show relatively long lifetimes, so that fluorescence (FL) [26,27] and time-resolved (TR) [26-28] modes have been used. It has been reported that, in some instances, the detection limits can be improved using the TR mode as the luminescent signal is integrated for a longer time than in the FL mode, although these results depend on the lifetime of each chelate. On the other hand, the similar luminescent features of the terbium(III)-fluoroquinolone chelates

would require the use of a separation technique such as LC to improve the selectivity of these methods.

The aim of this paper has been to describe for the first time the usefulness of terbium(III)-sensitised luminescence for the determination of flumequine in food samples. A comparative study of the terbium(III)-flumequine system has been carried out using both FL and TR measurements and both batch (B) and post-column derivatisation LC techniques. The better selectivity of the LC methods justifies that they have been applied to the analysis of milk, chicken muscle and chicken liver samples, after the homogenisation of samples and a deproteinisation step, without any further clean-up procedure. The performance of the methods for these analyses has been validated following the EC recommendations [4].

2. EXPERIMENTAL

2.1. Apparatus and instruments

An SLM Aminco (Urbana, IL, USA) AB2 luminescence spectrometer provided with a 150 W continuous xenon lamp and a 7 W pulsed xenon lamp, equipped with a conventional 110-QS Hellma cell (Hellma Hispania, Barcelona, Spain) was used for monitoring FL

and TR batch measurements, respectively. Chromatography was performed on a modular liquid chromatograph integrated by a Jasco PU-2089 Plus (Jasco, Tokyo, Japan) high-pressure quaternary gradient pump, a 7125 Rheodyne (Cotati, CA, USA) high-pressure manual injection valve with a 20- μ l injection loop, and a Synergi Fusion-RP-80A column (Phenomenex, USA), 250 x 4.6 mm id 4 μ m, used as analytical column. A Gilson (Villiers-le-Bel, France) Minipuls-3 low pressure peristaltic pump and Omnifit (Cambridge, UK) Teflon tubing of 0.5 mm id were also used for constructing the post-column derivatisation manifold. A 176-052-QS Hellma (Hellma Hispania, Barcelona, Spain) flow cell with an inner volume of 18 μ L was used. Luminescence measurements were performed at room temperature.

2.2. Reagents and solutions

All chemicals used were of analytical reagent grade. All solutions were prepared using doubly distilled water, obtained by a Millipore (Bedford, MA, USA) Milli-Q system. Stock solutions (100 μ g ml⁻¹) of flumequine (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) were prepared in 0.1 M sodium hydroxide. Other quinolones (100 μ g ml⁻¹), i.e. ciprofloxacin hydrochloride (Lesvi Laboratories, Barcelona, Spain), oxolinic acid (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), danofloxacin mesylate (Pfizer, Amboise, France), enrofloxacin (Hipra Laboratories,

S.A., Girona, Spain), difloxacin (Fort Dodge Veterinaria, Girona, Spain), marbofloxacin (Vetoquinol, S.A., Lure, France) and sarafloxacin hydrochloride (Sigma-Aldrich, Seelze, Germany), were also prepared in 0.1 M sodium hydroxide. These solutions were stored at 4°C and were stable for at least a month. Working solutions were daily prepared by their dilution in water.

2.2.1. Reagents for batch methods. A 1 mM terbium(III) solution was prepared by dissolving the appropriate amount of terbium(III) nitrate pentahydrate (Aldrich, Gillingham, Dorset, UK) in water. Tris(hydroxymethylamino)methane (Tris) (0.5 M, pH 7.6) and sodium dodecylsulfate (SDS) (0.1 M) (Aldrich-Gillingham, Dorset, UK) were prepared .

2.2.2. Reagents for the integrated LC/derivatization methods. A 10 mM terbium(III) solution was prepared by dissolving the appropriate amount of terbium(III) nitrate pentahydrate in HAc/NH₄Ac buffer (100 mM, pH 6.7, Merck, Darmstadt, Germany). A solution containing acetic acid (Merck, Darmstadt, Germany) (30 mM, pH 3.0) and acetonitrile (HPLC-grade, Panreac Quimica S.A., Barcelona, Spain) in a 30:70 ratio was used as mobile phase.

2.3. Sample treatment

According to the Commission Directive 96/23/EC [4], fortified samples have been used as alternative to the un-availability of adequate CRM samples. Different blank aliquots of tissue and milk samples were spiked with minimum volumes of solutions containing the necessary concentrations of flumequine. The samples were stored at 4° C for 24 h, thus allowing the incorporation of the antibiotic on the matrix and were analysed according to the following procedures:

Chicken liver and muscle samples: Liver (1.0 g) or muscle (2.0 g) samples were shaken in 4 ml of acetonitrile for 10 minutes. The suspension was centrifuged at 3000 rpm for 15 min, the separated organic extract was adjusted to an apparent pH of 4 and used to determine the flumequine concentration using the LC methods below mentioned.

Milk samples: 1.0 g of milk sample was treated with 1.0 ml of a 20% solution of trichloroacetic acid in methanol and shaken for 1 min. The suspension was treated as described above for tissue samples, and a similar procedure was followed.

2.4. Determination of flumequine by batch methods

Solutions containing flumequine (0.18-600 and 2.4-150 ng ml⁻¹ for FL and TR modes, respectively), terbium(III) (75 μM), SDS (10 mM) and Tris buffer (50 mM, pH 7.6) were prepared in a 10-ml volumetric flask. The luminescence intensity of these solutions was measured at 545 nm, using 340 and 250 nm as the excitation wavelength for FL and TR mode, respectively. A 16-nm band-width was selected for both excitation and emission slits. Measurements in the TR mode were performed using 0.03, 2 and 10 ms as delay, gate and cycle times, respectively. The blank signal was subtracted from each measurement.

2.5. Determination of flumequine by LC methods

The integrated LC separation and derivatization system is shown in Figure 1. Reverse-phase liquid chromatography (RP-LC), involving a C₁₈ column as stationary phase and an isocratic solution containing a mixture of 30:70 acetic acid (30 mM, pH 3.0) : acetonitrile as mobile phase at a flow-rate of 1 ml min⁻¹, was used. The organic solution containing the analyte in a concentration range of 3.7-1000 ng ml⁻¹ (FL mode) or 52-3000 ng ml⁻¹ (TR mode), was introduced into the column by means of the injection valve with a 20-μl loop.

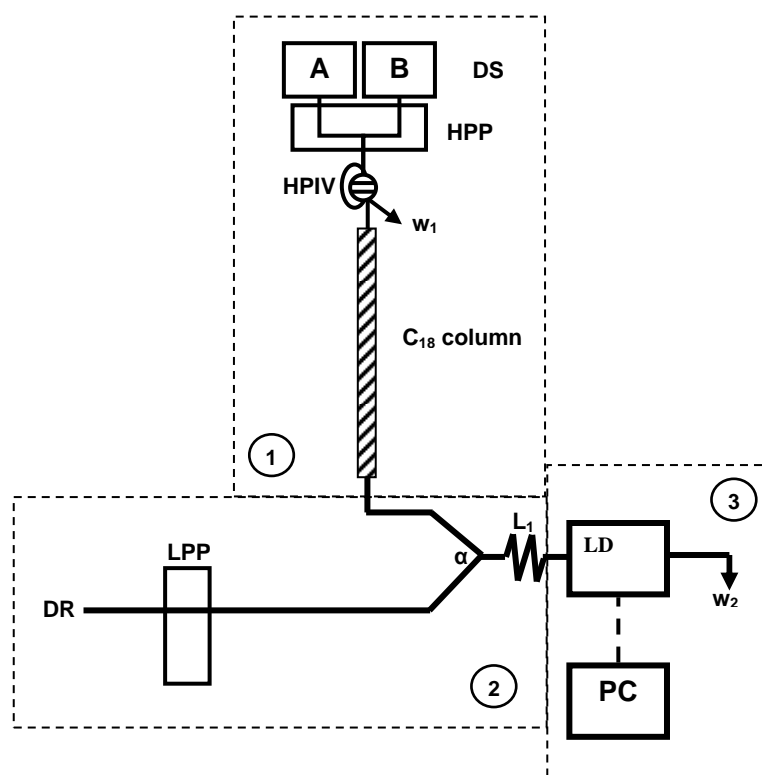


Figure 1. Integrated LC/derivatisation and detection system. 1, 2 and 3 depict the chromatography, derivatising and detection subsystems, respectively. A and B, denote 30 mM acetic acid and acetonitrile solutions; DS, delivery system; HPP, High-pressure quaternary gradient pump; HPIV, high-pressure injection valve; LPP, low-pressure pump; L₁, mixing reactor; LD, luminescence detector; PC, personal computer; DR, derivatising reagent; w_1 and w_2 , waste

The eluate was merged at point α (Figure 1) with a solution containing 10 mM of terbium(III) prepared in HAc/NH₄Ac buffer (100

mM, pH 6.7) and pumped at a flow-rate of 0.6 ml min^{-1} . The mixed solution was passed through the reactor L_1 , in which the derivatization reaction took place. Finally the analytical signal was monitored for 5 min using FL and TR modes, subtracting the corresponding blank solutions. Each solution was assayed in triplicate. Chromatograms were taken using the original software of the luminescence spectrometer and the raw data of luminescence intensity and time were exported and treated using Origin 7 software for the calculation of peak areas.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. *Characterization of the luminescent system*

The chelate formation between flumequine and terbium(III) ion was tested in order to develop a selective luminescence method for flumequine in the presence of other quinolones. Thus, measurements of the luminescence of the terbium-flumequine chelate were performed in FL and TR modes. For FL mode, the excitation spectra showed a wide band and 340 nm was selected, while in TR mode the measurements had its maximum at 250 nm. These differences in the excitation wavelength would be ascribed to the different luminescence lifetimes obtained at each one, being 0.85

ms at 250 nm. This relatively long lifetime allows the achievement of a luminescence signal, using the TR mode, higher than that obtained by the FL mode, using in both instances 250 nm as the excitation wavelength. However, the luminescent system had the opposite behaviour by exciting at 340 nm.

It has been extensively reported [26] that the use of synergetic agents can reduce in some cases the number of water molecules surrounding the lanthanide ion inside its coordination sphere, allowing an enhancement of the luminescence intensity. Tri n-octylphosphine oxide (TOPO) and tenoyltrifluoroacetone (TTA) were assayed in the range 1-50 μM for this purpose. It was found that TOPO did not have any effect on the luminescence of the system, and TTA caused a decrease, by a 20% of the signal obtained in its absence, when its concentration was 20 μM . The potential effect of surfactants on the system, which protect the chelate from non-radiative processes, was also investigated. A cationic, anionic and non-ionic surfactants, namely cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), sodium dodecyl sulphate (SDS) and Triton X-100 were assayed at concentrations below and above their c.m.c. It was found that 0.03% Triton X-100 and 5 mM CTAB caused a decrease by approximately a 10% of the signal obtained in their absence. Only

SDS caused a positive effect on the luminescent signal, as described below.

3.2. Study of variables

All variables involved in the batch and LC methods were optimised using the univariate methodology. Values chosen were those yielding the maximum luminescence signal with a minimum standard deviation. Table 1 summarises the range studied and the optimum values for each variable.

3.2.1. Variables affecting batch methods

The effect of the pH on the system was studied using hydrochloric acid or sodium hydroxide solution. The maximum luminescent signal was in the range 7.3–7.9 (Table 1). A sharp decrease in the luminescence signal at lower or higher pH values was observed. Tris and ammonium chloride/ammonium hydroxide buffer solutions were assayed in the range 20–70 mM to adjust the pH. The ammonium chloride buffer did not have any influence on the signal, but an increase was observed in the presence of Tris, which was chosen to perform batch methods.

Table 1. Study of variables for batch and LC methods

Approach	Variables	Range studied	Optimum values
Batch methods	pH	4.0 – 9.0	7.3-7.9
	Tris buffer, mM	20 - 70	50
	Tb (III), mM	0.05 – 1.0	0.075
	SDS, mM	5 - 15	10
Chromatographic separation	Flow rate, ml min ⁻¹	0.5 – 2.0	1.0
	pH	2.3 – 3.5	3.0
	HAc, mM	10 – 200	30
Post-column derivatisation	Flow-rate, ml min ⁻¹	0.3 – 1.0	0.6
	Length of reactor L ₁ , cm	20 – 100	50
	pH	3.0 – 8.0	6.3-7.3
	HAc/NH ₄ Ac buffer, M	0.05 – 0.5	0.1
	Tb(III), mM	10 – 50	9-13
Time-resolved detection	Delay time, ms	0.012 - 30	0.03
	Gate time, ms	0.001 - 30	2
	Cycle time, ms	5 - 30000	10

The optimum concentration of terbium(III) was 0.075 mM. The analytical signal obtained in the presence of 10 mM SDS was increased by a 10% of that obtained in its absence, decreasing this at higher concentrations.

3.2.2. *Variables affecting LC methods*

Chromatographic variables. A negative aspect of the use of post-column derivatization with terbium(III) in RP-LC is the quenching effect that a high water content causes on the sensitised luminescence [29]. The presence of an acid together with acetonitrile in the mobile phase can minimize this quenching effect by displacing water from the coordination sphere of terbium(III), providing also the adequate pH to reach the required chromatographic resolution. Orthophosphoric and oxalic acids were assayed at several concentrations for this purpose, but they caused the precipitation of terbium. On the contrary, the presence of acetic acid improved the analytical signal.

An objective of the optimization of the chromatographic variables was to choose the best experimental conditions to avoid the potential interference of other quinolones. The study of the effect of the apparent pH of the mobile phase showed that it is a critical variable to attain the required selectivity. The best results were obtained when the pH and the acetic acid concentration were 3.0 and 30 mM, respectively (Table 1). Binary mixtures of acetic acid (30 mM, pH 3.0) and acetonitrile were assayed following isocratic and gradient profiles. An isocratic solution containing 30:70 acetic acid:acetonitrile

as mobile phase with a flow-rate of 1.0 ml min^{-1} provided adequate experimental conditions to determine flumequine in only 5 min.

Post-column derivatization variables. The flow rate of the derivatising reagent solution was changed by keeping constant the flow rate of the chromatographic effluent at 1 ml min^{-1} . Flow-rates higher than 1.2 ml min^{-1} caused high-pressure at the mixing point α and produced back-flowing through the separation system. A flow-rate of 0.6 ml min^{-1} provided the optimum terbium(III) solution-column effluent ratio. The length of the reactor L_1 was optimized in order to obtain an appropriate residence time for the derivatization reaction (Table 1). Longer reactors than 50 cm considerably increased dispersion phenomena, thus decreasing the separation efficiency. Under these hydrodynamic conditions, the pH of the derivatising reagent was evaluated using an ammonium acetate buffer solution (Table 1), in order to increase the pH of the chromatographic effluent without terbium hydroxide precipitation from the reagent solution. A notable reduction in the peak area was observed at pH values out of the range 6.3–7.3. Ammonium acetate buffer was used to adjust the pH of the system to the optimum value. The study of the influence of terbium (III) concentration showed (Figure 2) that the signal was independent of this variable in the range 9-13 mM.

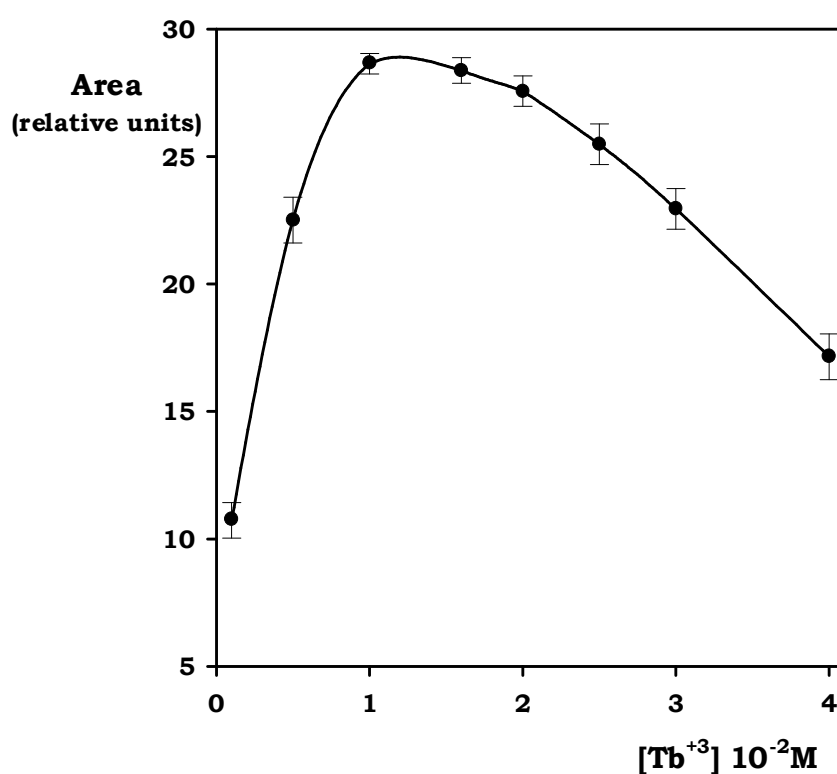


Figure 2. Optimisation of the terbium(III) concentration in the LC system, using the TR mode. The study was carried out under optimum chromatographic and luminescence detection conditions. Derivatisation reaction conditions: flow-rate: 0.6 ml min⁻¹, reactor length: 50 cm, pH 6.7, [HAc/NH₄Ac] = 0.1 M; [flumequine] = 1000 ng ml⁻¹

3.3. Features of the methods

Calibration graphs were run using the optimum experimental conditions. Table 2 summarises their features, in which can be seen that the *r* values indicate a good fitness of the experimental data to each calibration curve. This table also shows the detection limits (LOD) obtained, which were calculated following IUPAC recommendations [30].

Table 2. Analytical features of the proposed methods

Method	Abbreviation	Linear range ⁽¹⁾	Slope ± SD	Intercept±SD	<i>r</i>	LOD ⁽¹⁾
Batch	B-FL	0.18–60	$(1.52 \pm 0.01) \times 10^{-1}$	0.04 ± 0.03	0.999	0.055
		60–600	$(1.2 \pm 0.1) \times 10^{-2}$	-0.09 ± 0.04	0.997	
	B-TR	2.4–150	$(4.9 \pm 0.2) \times 10^{-2}$	0.2 ± 0.1	0.995	0.7
LC	LC-FL	3.7-1000	$(1.24 \pm 0.02) \times 10^{-1}$	2 ± 1	0.999	1.1
		LC-TR	52-3000	$(2.7 \pm 0.1) \times 10^{-2}$	2 ± 1	0.996

⁽¹⁾ All concentrations are expressed in ng ml⁻¹

The FL mode reaches LODs about thirteen times lower than those obtained by the TR-mode, while the LODs obtained by the batch approach are about twenty times lower than by LC. The dilution of the column eluent by the derivatization solution contributes to increase the LODs of the LC methods. However, these values are

better than those obtained for other LC methods described for flumequine determination based on mass spectrometry [10] or on the measurement of its native fluorescence [17,21]. The precision of the four methods (relative standard deviation) was evaluated using standards at two analyte concentration levels, which were different depending on the method. Table 3 shows the results obtained, which were in the ranges 3.1-5.1% and 1.6-4.4% for the batch and LC methods, respectively. The sample throughput under the optimum working conditions for the LC methods was approximately of 12 h⁻¹, calculated without taking into account the sample preparation.

Table 3. Study of Precision

Method	Concentration added (ng ml ⁻¹)	RSD (%)
Batch	20.0	3.6
	200.0	3.1
	20.0	4.9
	200.0	5.1
Chromatography	15.0	2.9
	400.0	1.6
	100.0	2.3
	250.0	4.4

The selectivity of the proposed methods was studied by assaying other quinolones commonly present in the samples analysed, which are susceptible to interfere the flumequine determination. Ciprofloxacin, danofloxacin, enrofloxacin difloxacin, marbofloxacin and sarafloxacin were studied by their addition to a standard solution of analyte (50 ng ml⁻¹) at concentration levels higher than those usually found in the target samples.

The results obtained using the batch method showed a 40:1 tolerated interference/analyte ratio for difloxacin and sarafloxacin, 25:1 for marbofloxacin and 1:1 for danofloxacin and ciprofloxacin. These results show that the selectivity of batch methods is not adequate for the flumequine determination in samples in which danofloxacin and ciprofloxacin are present.

However, the development of the LC method provides the selectivity required as can be seen in Figure 3, which depicts the chromatograms obtained for flumequine in the absence and in the presence of several quinolones. Thus, the method is suitable to obtain quantitative flumequine separation, expressed in terms of selectivity and resolution factor, from other potential quinolones present in the sample in the lowest possible separation time.

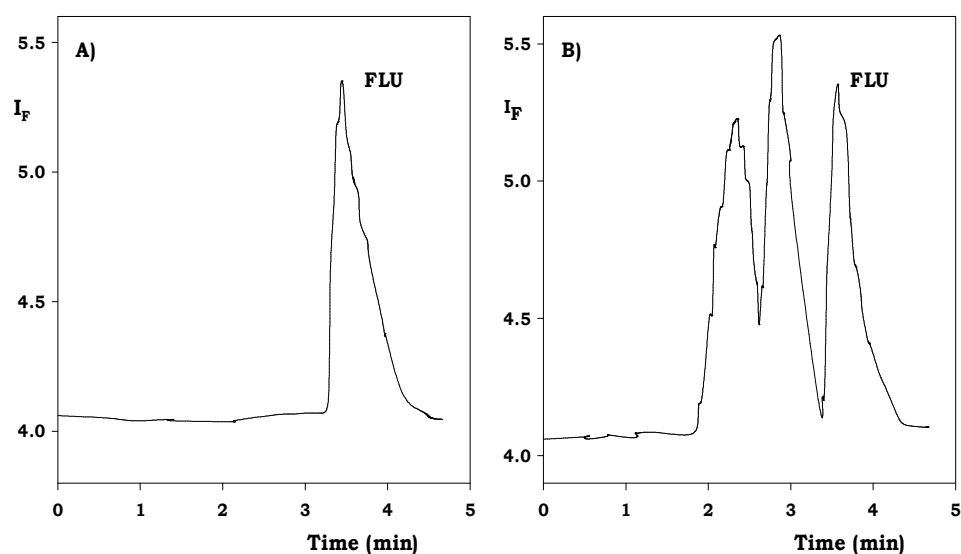


Figure 3. Chromatograms obtained for flumequine (300 ng ml^{-1}) using post-column derivatisation with terbium(III) and the FL mode in the absence (A) and in the presence (B) of a mixture containing 300 ng ml^{-1} of marbofloxacin, ciprofloxacin, danofloxacin, enrofloxacin, sarafloxacin, difloxacin, oxolinic acid and flumequine. Experimental conditions are the optimal

3.4. Applications

In order to establish the regulatory confirmation analysis using the 2002/657/EC recommendations [4], chicken liver and muscle samples were tested using the LC-TR and LC-FL proposed methods. Whole milk was only tested using the LC-FL method as the LC-TR approach provides regulatory values higher than those accepted by

EC recommendations. The LODs obtained using the LC-FL method were adequate to determine flumequine without any pre-concentration step. Table 4 shows the maximum residue limits (MRL), the decision limit (CC_{α}) and the detection capability (CC_{β}) for flumequine achieved for each sample.

Table 4. EC recommendation parameters

EC parameter ⁽¹⁾	LC-TR method		LC-FL method		
	Chicken muscle	Chicken liver	Chicken muscle	Chicken liver	Whole milk
MRL	400	800	400	800	50
CC_{α}	434	885	431	817	55
CC_{β}	468	971	462	834	60

MRL denotes maximum residue limit; CC_{α} , decision limit and CC_{β} , detection capability

⁽¹⁾ All concentrations expressed in $\mu\text{g kg}^{-1}$

The sample treatment only consisted of a deproteinisation step in all instances. The recovery study was performed by preparing three sets, of six samples each one, and adding flumequine at different concentration levels. The concentrations assayed were 0.75, 1 and 2 MLR for chicken muscle, 0.75, 1 and 1.5 MLR for chicken liver, and 0.6, 1 and 1.4 MLR for milk samples. Table 5 summarized the concentration found, the standard deviation for each set of samples, and the recoveries obtained. As it can be seen, the recovery values were in the range 95.0–103.8 %.

Table 5. Recoveries of the flumequine added to samples

Sample	Added ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Method			
		LC-TR		LC-FL	
		Found ^a ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Recovery (%)	Found ^a ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Recovery (%)
Chicken muscle	300	300 \pm 20	100.0	302 \pm 8	100.7
	400	380 \pm 20	95.0	410 \pm 20	102.5
	800	810 \pm 30	101.3	790 \pm 30	98.8
Chicken liver	600	570 \pm 40	95.0	610 \pm 40	101.7
	800	780 \pm 60	97.5	830 \pm 10	103.8
	1200	1220 \pm 70	101.7	1196 \pm 3	99.7
Whole milk	30	---	---	29 \pm 2	96.7
	50	---	---	50 \pm 3	100.0
	70	---	---	68 \pm 1	97.1

^aMean \pm SD (n =6)

4. CONCLUSIONS

The usefulness of terbium-sensitised luminescence for flumequine determination in food samples is described for the first time. The comparative study carried out using batch and LC techniques with FL and TR detection shows that LC with post-column derivatisation is a selective option to determine flumequine in the presence of other quinolones. The relatively low quantification limits obtained, which are lower than the MRLs permitted by EU legislation, allow the direct injection of the sample extracts after their

deproteinisation, without any pre-concentration step. The relatively long emission wavelength of the terbium chelate can help to reduce the interference from some components of the sample matrix, which could overlap in the chromatogram performed measuring the native fluorescence of flumequine. Thus, the use of SPE to clean-up the samples is avoided by this approach. The proposed method has been validated in order to check out its usefulness for the analysis of real samples with satisfactory results.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors gratefully acknowledge financial support from the Spanish DGICYT (Dirección General de Investigación del Ministerio de Ciencia y Tecnología) Grant no. BQU2003-03027.

REFERENCES

- [1] C. Chee-Sanford, R.I. Aminov, I.J. Krapac, N. Garrigues-Jeanjean, R.I. Mackie, *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (2001) 1494.
- [2] S.E. Jorgensen, B. Halling-Sorensen, *Chemosphere* 40 (2000) 691.

- [3] Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Evaluation of certain food additives and contaminants: sixty-second report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Technical Report Series 925. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. Rome, 2004.
- [4] 2002/657/EC Commission Decision of 12 August 2002. Implementing Council Directive 96/23/EC Concerning the Performance of Analytical Methods and the Interpretation of Results, O. J., L221 (2002) 8.
- [5] Summary reports of the committee for veterinary medicinal products, The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA). EMA/MRL/104/96-FINAL.
<http://www.eudra.org/emea.html>
- [6] Summary reports of the committee for veterinary medicinal products, The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA). EMA/MRL/707/99-FINAL.
<http://www.eudra.org/emea.html>
- [7] Commission Regulation (EC) No 1181/2002 of 1 July 2002 amending Annex I of Council Regulation (EEC) No 2377/90 laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin, O. J., L172 (2002) 13.

- [8] J. Nouws, H. van Edmond, I. Smulders, G. Loeffen, J. Schouten, H. Stegeman, *Int. Dairy J.*, 9 (1999) 85.
- [9] G.E. Pellegrini, G. Carpico, E. Coni, *Anal. Chim. Acta*, 520 (2004) 13.
- [10] S. Bailac, D. Barrón, V. Sanz-Nebot, J. Barbosa., *J. Sep. Sci.*, 29 (2006) 131.
- [11] B. Toussaint, M. Chedin, G. Bordin, A.R. Rodríguez, *J. Chromatogr. A*, 1088 (2005) 32.
- [12] N. Van Hoof, K. De Wasch, L. Okerman, W. Reybroeck, S. Poelmans, H. Noppe, H. De Brabander. *Anal. Chim. Acta*. 529 (2005) 265.
- [13] J.M. Delmas, A.M. Chapel, P. Sanders, *J. Chromatogr. B*, 712 (1998) 263.
- [14] S.M. Plakas, K.R. el Said, F.A. Bencsath, S.M. Musser, C.C. Walker, *J. AOAC Int.*, 82 (1998) 614.
- [15] J. Guyonnet, M. Pacaud, M. Richard, A. Doisi, F. Spavone, P. Hellings, *J. Chromatogr. B*, 679 (1996) 177.
- [16] A. Kirbis, J. Marinsek, V.C. Flajs, *Biomed. Chromatogr.*, 19 (2005) 259.
- [17] B. Roudaut, J.C. Yorke, *J. Chromatogr. B*, 780 (2002) 481.
- [18] J.C. Yorke, P. Froc, *J. Chromatogr. A*, 882 (2000) 63.
- [19] AOAC Peer-verified method PVM 1:1995. <http://aoac.org/>

- [20] J.A. Hernández-Arteseros, J.L. Beltrán, R. Compañó, M.D. Prat, *J. Chromatogr. A*, 942 (2002) 275.
- [21] M. Ramos, A. Aranda, E. García, T. Reuvers, H. Hooghuis, *J. Chromatogr. B*, 789 (2003) 373.
- [22] R.J. Maxwell, E. Cohen, *J. High Resol. Chromatogr.*, 21 (1998) 241.
- [23] C. Ho, D.W.M. Sin, H.P.O. Tang, L.P.K. Chung, S.M.P. Siu, *J. Chromatogr. A*, 1061 (2004) 123.
- [24] G. Yang, B. Lin, Z. Zeng, Z. Chen, X. Huang, *J. AOAC Int.*, 88 (2005) 1688.
- [25] E. Verdon, P. Couedor, B. Roudaut, P. Sanders, *J. AOAC Int.*, 88 (2005) 1179.
- [26] A. Gómez-Hens, M.P. Aguilar-Caballos, *Trends Anal. Chem.*, 21 (2002) 131-141.
- [27] R.C. Rodríguez-Díaz, M.P. Aguilar-Caballos, A. Gómez-Hens, *Anal. Chim. Acta*, 494 (2003) 55.
- [28] R.C. Rodríguez-Díaz, M.P. Aguilar-Caballos, A. Gómez-Hens, *Anal. Lett.*, 37 (2004) 1163.
- [29] A. Rieutord, P. Prognon, F. Brion, G. Mahuzier, *Analyst*, 122 (1997) 59R.
- [30] G.L. Long, J.D. Winefordner, *Anal. Chem.* 55 (1983) 712A.

**II.6. DETERMINATION OF FLUOROQUINOLONES IN MILK
SAMPLES BY POST-COLUMN DERIVATIZATION LIQUID
CHROMATOGRAPHY WITH LUMINESCENCE DETECTION**

Trabajo enviado a la revista "Journal of Chromatography A".

Nuevas estrategias metodológicas mediante iones lantánidos aplicables al análisis de rutina

**DETERMINATION OF FLUOROQUINOLONES IN MILK SAMPLES
BY POST-COLUMN DERIVATIZATION LIQUID
CHROMATOGRAPHY WITH LUMINESCENCE DETECTION**

R.C. Rodríguez-Díaz, J. M. Fernández-Romero, M. P. Aguilar-Caballos and
A. Gómez-Hens

Department of Analytical Chemistry. "Marie Curie Annex" building.
Campus of Rabanales. University of Córdoba, E-14071 Córdoba, Spain

ABSTRACT

A LC method with luminescence detection for the determination of eight quinolone antibiotics is reported. The system encompasses three consecutive steps: a) chromatographic separation using reverse-phase mode (RP-LC), b) post-column derivatization reaction and c) luminescence detection by monitoring fluorescence (FL) and time-resolved (TR) signals. The derivatization step is based on the reaction between quinolones and terbium(III) to form luminescent chelates, which were determined at λ_{ex} 340, λ_{em} 545 nm (FL mode) or at λ_{ex} 281, λ_{em} 545 nm (TR mode). Dynamic ranges of the calibration graphs, obtained with standard solutions of analytes and FL and TR modes, respectively, were (ng ml^{-1}): marbofloxacin (190-

3500, 316-2000), ciprofloxacin (8-3500, 8.1-1500), danofloxacin (6.2-3500, 13-1500), enrofloxacin (7.4-3500, 8.4-1500), sarafloxacin (14-3500, 20-2000), difloxacin (12.5-3500, 13.9-1200), oxolinic acid (7.6-3500, 13-3000) and flumequine (9-2000, 130-3000). LODs values obtained using FL and TR modes, respectively, were (ng ml^{-1}): marbofloxacin (60, 95), ciprofloxacin (2, 2.4), danofloxacin (1.9, 3.9), enrofloxacin (2.2, 2.5), sarafloxacin (3.8, 7), difloxacin (4, 4.2), oxolinic acid (2.3, 4) and flumequine (2.7, 40). The precision was established at two concentration levels of each analyte and expressed as the percentage of relative standard deviation with values ranged between 1.9 and 7.8 %. The validation procedure for the analysis of samples was carried out using EC recommendations, and the decision limit and detection capability were calculated for bovine whole milk. The method was applied to whole, semi-skimmed and skimmed milk samples spiked with the target analytes and the recoveries ranged between 93.3 % and 106.0 %.

Keywords: post-column derivatization, fluoroquinolones, terbium, luminescence detection, milk samples

1. INTRODUCTION

Quinolones are a group of antibiotics used for the prevention of diseases caused by several bacterial agents. Some of them can be used for the treatment of different animal species, including those destined to food production. Maximum residue limits for quinolones in different food samples are defined by authorities [1] in order to prevent the growth of antibiotic-resistant bacteria in humans. This is such an important issue that the characterization of analytical methods and the interpretation of results have been recently revised in the European legislation [2].

The antibacterial activity of these antibiotics has given rise to different microbiological methods for their determination in milk samples [3,4]. Liquid chromatography methods with mass spectrometry [5], tandem mass spectrometry [6,7], UV [8,9] and fluorimetry [8, 10-16] as detection systems have been reported for the determination of mixtures of quinolones in different samples. The methods focusing on the analysis of milk samples usually involve the deproteinization and subsequent clean-up and/or preconcentration steps by solid-phase extraction (SPE). Thus, potential interferences from sample matrix can be removed and the required sensitivity levels can be achieved, taking into account the low MRL defined for

these antibiotics in milk samples [1]. Although an automated approach for SPE involving column-switching chromatography has been reported [10], this step is usually carried out off-line before the chromatographic separation [5-9, 13, 15], what can decrease the effective sample throughput of these methods.

Terbium-sensitized luminescence (TSL) has been widely used for the development of relatively sensitive luminescent methods for the direct determination of organic species [17]. In general, the sensitivity of these methods depends on the efficiency of the intramolecular energy transfer between the ligand and the lanthanide and on the relatively long emission wavelength of these chelates, at which the contribution of background signals is lower than that at shorter wavelengths. In some instances, the sensitivity of these methods can be also improved by using the time-resolved (TR) mode, owing to the relatively long lifetime of these chelates. In addition, some potential interferences from sample matrix, which usually emit at shorter wavelengths, can be avoided. Concerning to the determination of quinolone antibiotics, TSL has been proposed for the individual determination [17-22] or for the resolution of binary mixtures of quinolones [17], being this latter performed by using kinetic methodology. Most of these methods have been applied to the analysis of biological fluids [17, 19-22], being their application to food

analysis [18,23,24] more limited up to date. The carboxylic and keto-groups of quinolones are involved in the chelate formation, depending the intensity of the luminescent signal on the substituent attached to the nitrogen atom of the pyridone ring [20]. Nevertheless, the luminescent behavior of these antibiotics is similar enough to prevent the individual determination of a quinolone in the presence of other components of this group. The use of a separation technique can improve the selectivity of the above mentioned methods, allowing tackling the simultaneous determination of a mixture of several quinolones.

The present work describes the usefulness of TSL for the simultaneous determination of eight quinolone antibiotics used in veterinary practice. Post-column derivatization LC methods using terbium(III) as reagent and TR and FL modes for luminescence detection are described for this purpose, and their features are compared. The LC-FL methods provide the required sensitivity level to carry out the determination of four quinolones that can be present in milk samples, namely ciprofloxacin, enrofloxacin, danofloxacin and flumequine. The sample treatment consisted of a deproteinization step without any further clean-up. This fact allows the achievement of a higher sample throughput compared to other LC methods with fluorimetric detection [8, 10-16] described for this purpose with

comparable detection limits. The method was validated by performing the recovery study and some parameters, such as decision limit (CC_{α}) and detection capability (CC_{β}), were also calculated [2].

2. EXPERIMENTAL

2.1. Apparatus and instruments

An SLM Aminco (Urbana, IL, USA) AB2 luminescence spectrometer provided with a 150 W continuous xenon lamp and a 7 W pulsed xenon lamp, and equipped with a conventional 110-QS Hellma cell (Hellma Hispania, Barcelona, Spain), was used for monitoring FL and TR batch measurements, respectively. Chromatography was performed on a modular liquid chromatograph integrated by a Jasco PU-2089 Plus (Jasco, Tokyo, Japan) high-pressure quaternary gradient pump, a 7125 Rheodyne (Cotati, CA, USA) high-pressure manual injection valve with a 20- μ l injection loop, and a Synergi Fusion-RP-80A column (Phenomenex, USA), 250 x 4.6 mm id 4 μ m, used as analytical column. A Gilson (Villiers-le-Bel, France) Minipuls-3 low-pressure peristaltic pump and Omnifit (Cambridge, UK) Teflon tubing of 0.5 mm id were also used for constructing the post-column derivatization manifold. A 176-052-QS

Hellma (Hellma Hispania, Barcelona, Spain) flow cell with an inner volume of 18 μL was used. Luminescence measurements were performed at room temperature.

2.2. Solvents and reagents

All chemicals used were of analytical reagent grade. All solutions were prepared in doubly deionized water, obtained using a Millipore (Bedford, MA, USA) Milli-Q system. Stock solutions ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) of ciprofloxacin hydrochloride (Lesvi Laboratories, Barcelona, Spain), danofloxacin mesylate (Pfizer, Amboise, France), difloxacin (Fort Dodge Veterinaria, Girona, Spain), enrofloxacin (Hipra Laboratories, S.A., Girona, Spain), marbofloxacin (Vetoquinol, S.A., Lure, France) were prepared using doubly deionized water. Oxolinic acid (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), flumequine (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) and sarafloxacin hydrochloride (Sigma-Aldrich, Seelze) were prepared at the same concentration in 0.1 M sodium hydroxide. These solutions were stored at 4°C for a month and further dilutions in water were used as working solutions.

A 10 mM solution of terbium(III) was prepared by dissolving the appropriate amount of terbium(III) nitrate pentahydrate (Aldrich, Gillingham, Dorset, UK) in HAc/NH₄Ac buffer (0.5 M, pH 6.0) (Merck,

Darmstadt, Germany). Mobile phase was constituted by solvents A (acetic acid (30 mM, pH 3.0); Panreac Quimica, S.A., Barcelona, Spain) and B (HPLC-grade acetonitrile, Panreac Quimica, S.A., Barcelona, Spain), which were mixed by operating in the gradient mode during the chromatographic separation.

2.3. Spiked milk samples

Different blank aliquots of milk samples were spiked with minimum volumes of solutions containing the necessary concentrations of the quinolones assayed. The samples were stored at 4° C for 24 h, thus allowing the incorporation of the antibiotic on the matrix and were analyzed according to the following procedure: 1.0 g of milk sample was treated with 1.0 ml of a 20 % solution of trichloroacetic acid in methanol and shaken for 30 s. The suspension was centrifuged at 3000 rpm for 15 min, the separated organic extract was adjusted to an apparent pH of 4 and used to determine the concentration of the fluoroquinolones using the LC-FL method below described.

2.4. Manifold and Procedure

Fig. 1 shows the 3-step integrated LC separation/derivatization approach. Standards or sample extracts (20 µl), containing the

analytes at concentrations within their respective linear ranges, were injected into the column. The mobile phase was pumped at 1 ml min^{-1} and the system operated under isocratic conditions for 10 min after the injection using an 82:18 acetic acid (30 mM, pH 3.0) – acetonitrile composition. Then, this was changed in 5 min to 40:60 acetic acid (30 mM, pH 3.0) – acetonitrile and hold in this proportion for 2 min. Finally, it returned to the initial composition in 2 min and after 1 min the system was ready for the next injection.

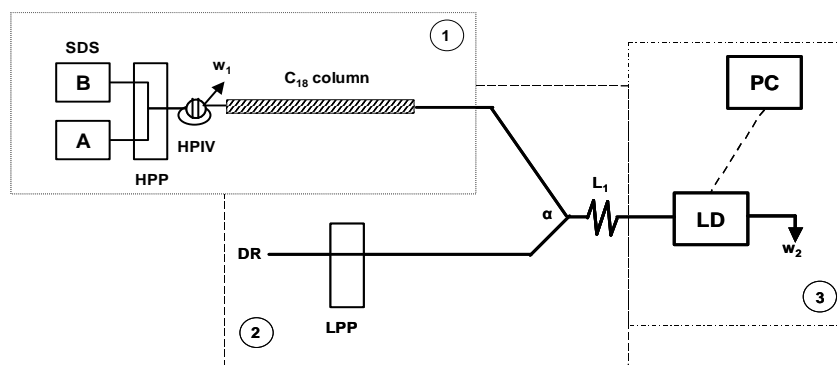


Fig. 1. Integrated separation-derivatization and detection approach. 1, 2 and 3 depicts the chromatography, derivatizing and detection subsystems, respectively. A, and B, denotes 30mM acetic acid and acetonitrile solutions; SDS, solvent delivery system; HPP, High-pressure quaternary gradient pump; HPIV, high-pressure injection valve; LPP, low-pressure pump; L_1 , mixing reactor; LD, Luminescence detector; PC, personal computer; DR, derivatizing reagent; w_1 and w_2 , waste

The eluate was merged at point α with a solution containing 10 mM terbium(III) prepared in HAc/NH₄Ac buffer (0.5 M, pH 6.0) and pumped at a flow-rate of 0.6 ml min^{-1} . The mixed solution passed

through the reactor L₁, in which the derivatization reaction took place. The analytical signal was monitored at λ_{ex} 340, λ_{em} 545 nm (FL mode) or at λ_{ex} 281, λ_{em} 545 nm (TR mode) for 20 min, and the corresponding blank solutions were subtracted. Each solution was assayed in triplicate. Chromatograms were taken using the original software of the luminescence spectrometer and the raw data of luminescence intensity and time were exported and treated using adequate software packages for the estimation the main chromatographic parameters.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. *Characterization of the luminescent system*

The intrinsic fluorescence of quinolones and the luminescence of their terbium chelates were studied by carrying out their excitation and emission spectra. As it has been already described in some methods dealing with individual determinations of quinolones using TSL [18,20], the excitation spectra showed relatively wide bands, while the emission spectra show a narrow band with maximum emission at 545 nm. Table 1 shows the values of maximum excitation and emission wavelengths obtained using FL and TR modes. Most of quinolones and their terbium chelates exhibited similar excitation wavelengths, excepting that for marbofloxacin,

which was longer. With the aim of make compatible the measurement of these luminescent systems, 340 nm was selected as the optimum wavelength for the simultaneous excitation of the chelates in the FL mode. A similar behavior was observed using TR measurements and 281 nm was selected as the compromise excitation wavelength.

Table 1. Excitation and emission wavelengths for quinolones and their terbium chelates

	Wavelength (nm)					
	Quinolone		Quinolone-Tb(III) chelate			
	FL ^a		FL ^a		TR ^a	
	λ_{ex}	λ_{em}	λ_{ex}	λ_{em}	λ_{ex}	λ_{em}
Marbofloxacin	355	498	355	545	295	545
Ciprofloxacin	332	446	332			
Danofloxacin	335	440	335		281	
Enrofloxacin	332	445	332			
Sarafloxacin	333	450	333			
Difloxacin	333	453	333			
Oxolinic acid	333	366	333			
Flumequine	337	380	337		250	

^aDetection mode: FL: fluorescence; TR: time-resolved

3.2. Optimization of Variables

The hydrodynamic and chemical variables involved in the LC methods were optimized using the univariate methodology. Values chosen were those yielding the maximum luminescence signal with a minimum standard deviation. Table 2 summarizes the range studied and the optimum value for each variable.

Table 2. Study of variables

Type	Variables	Range studied	Optimum value
Liquid Chromatography	Column (stationary phase)	-	C ₁₈ , 4 μm, 250 x 4.6
	Flow rate, ml min ⁻¹	0.5 – 2.0	1.0
	Initial mobile phase (HAc: acetonitrile)	-	82:18
	Gradient and isocratic program	(See Fig 2)	(See Fig 2)
	pH	2.3 – 3.5	3.0
	HAc concentration, mM	10 - 200	30
Post-column Derivatization	Flow-rate, ml min ⁻¹	00.3 – 1.0	0.6
	Length of reactor L ₁ , cm	20 - 100	50
	pH	2.0 – 8.0	6.0
	Tb(III) concentration, mM	10 - 200	10
	HAc/NH ₄ Ac buffer conc., M	0.2 – 2.0	0.5
Time-resolved mode	Delay time, ms	0.012 - 30	0.03
	Gate time, ms	0.001 - 30	2
	Cycle time, ms	5 - 30000	10

Chromatographic variables. The luminescence of lanthanide chelates can be quenched by the vibration of hydroxyl- groups of water molecules [17], which is really notable when RP-LC is used due to the relatively high content of water in the mobile phases used. This effect can be minimized by adding a synergetic agent or by introducing an acid in the mobile phase, which additionally provides the acidic medium necessary to achieve the required chromatographic resolution [25]. Orthophosphoric and oxalic acids were assayed for this purpose, resulting in terbium(III) precipitation. Acetic acid was chosen to prepare the mobile phase as it had a positive influence on the signal of the system.

A remarkable objective of the optimization of the chromatographic variables was to achieve the best separation of the analytes in the lowest separation time. The study of the effect of the apparent pH of the mobile phase showed that it is a critical variable to attain the required chromatographic selectivity. The shape of peaks was more definite at pH 3.0 and 30 mM acetic acid (Table 2). There was not any improvement on the results obtained at lower pH and the long-term stability of the column could be affected by operating at pH values close to 2.0. Binary mixtures of acetic acid (30 mM, pH 3.0) and acetonitrile using isocratic and gradient profiles were assayed at the optimum flow rate (1 ml min⁻¹). Figure 2.A shows the gradient

programs used and Figure 2.B the corresponding separation of quinolones achieved under these hydrodynamic conditions.

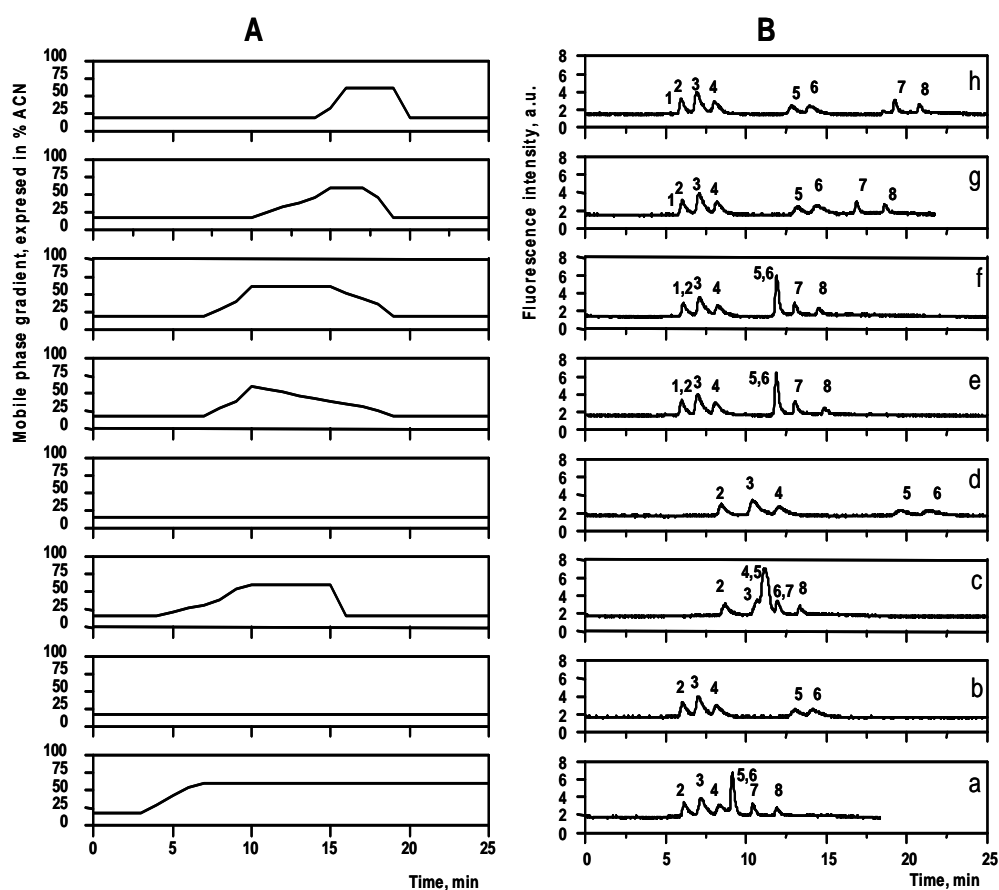


Fig. 2. Influence of the mobile phase composition. A) Isocratic and gradient programs, expressed as % of acetonitrile (ACN) in the mobile phase. B) Chromatogram profiles achieved in each case. 1, denotes, marbofloxacin; 2, ciprofloxacin; 3, danofloxacin; 4, enrofloxacin; 5, sarafloxacin; 6, difloxacin; 7, oxolinic acid; and 8, flumequine

The best resolution for ciprofloxacin, danofloxacin and enrofloxacin together with the lowest retention times for flumequine and oxolinic acid were obtained using the gradient conditions corresponding to the chromatograph depicted as “g”. The separation of the eight quinolones was achieved in about 19 min. These conditions were used for the development of the chromatographic separation and have been detailed under the procedure section.

Post-column derivatization variables. The study of the flow-rate of the derivatizing reagent solution showed that 0.6 ml min^{-1} provided the optimum terbium(III) solution-column effluent ratio when 1 ml min^{-1} was used for the chromatographic separation. Higher flow-rates than 1.2 ml min^{-1} caused overpressure at the mixing point and backflowing into the chromatographic column. The length of the reactor L_1 was evaluated in order to allow an adequate residence time for the derivatization mixture. Dispersion phenomena, which are present in flow systems and can decrease the separation efficiency, were observable using reactors longer than 50 cm (Table 2). An ammonium acetate buffer solution was chosen to increase the pH of the chromatographic eluent to achieve the optimum luminescence signal without terbium hydroxide precipitation. There was a notable reduction in the peak area when the pH was higher than 6.0. The influence of terbium(III) concentration (Figure 3) was evaluated for

each quinolone-terbium chelate, finding that in most cases, the area was independent of terbium concentration from 10 mM. Only marbofloxacin showed higher luminescence intensity at lower terbium concentrations. Figure 4 depicts a chromatogram obtained for a standard mixture of quinolones, including their corresponding chemical structures, carried out under optimum conditions using the LC-FL method.

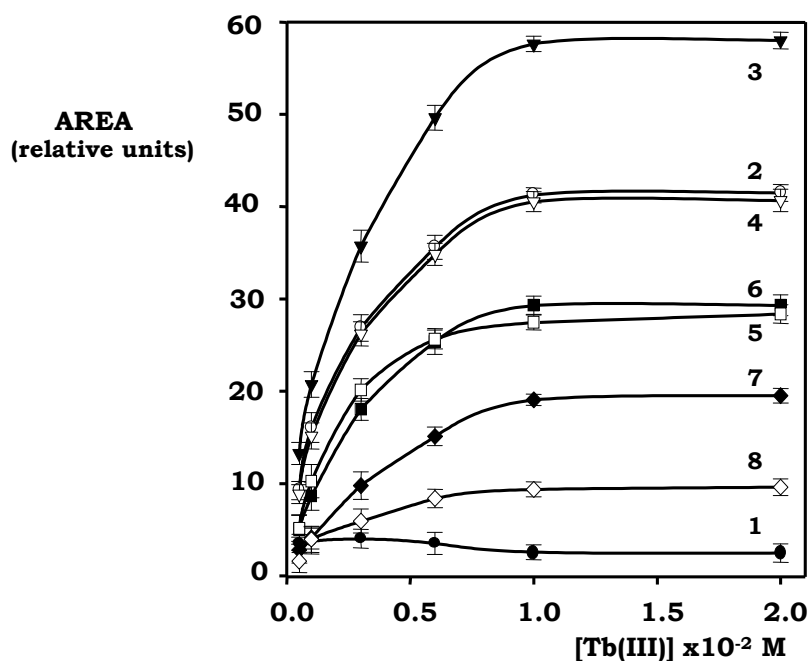


Fig. 3. Influence of the terbium (III) concentration for 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of the eight quinolones using the LC-TR mode under the optimum experimental conditions. 1, denotes, marbofloxacin; 2, ciprofloxacin; 3, danofloxacin; 4, enrofloxacin; 5, sarafloxacin; 6, difloxacin; 7, oxolinic acid; and 8, flumequine

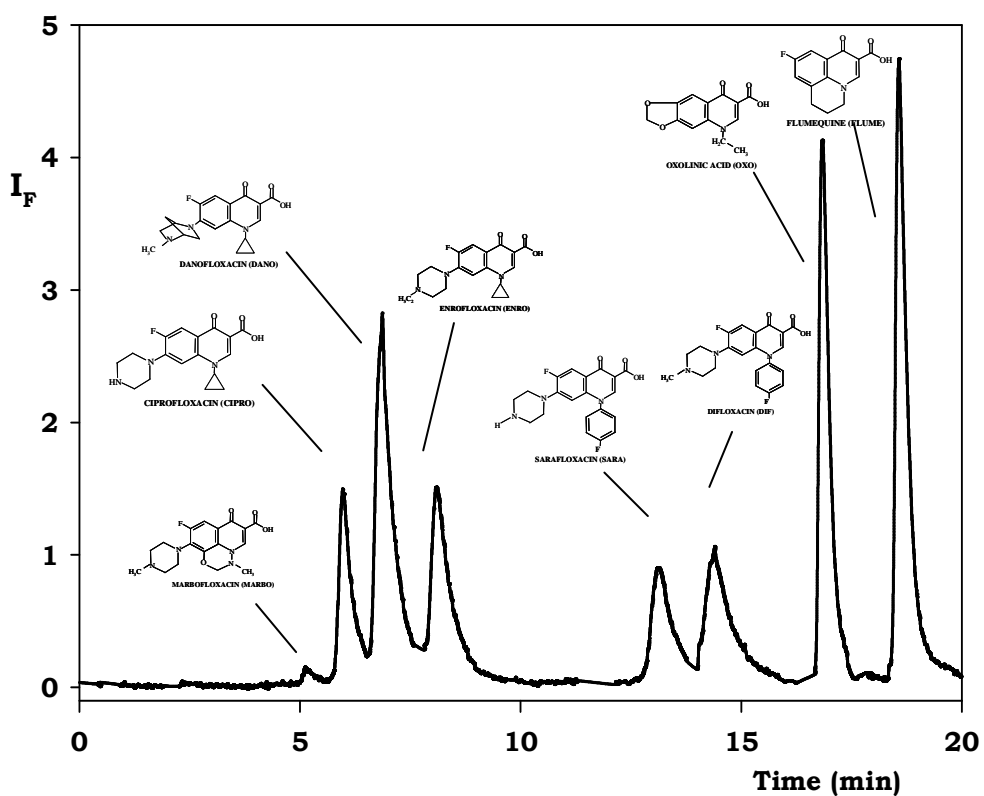


Fig. 4. Chemical structures of the analytes and typical chromatogram achieved for the fluorescence detection mode. All chromatogram was achieved by injection of a standard solution containing 1500 ng ml^{-1} of each analyte and processed under the optimum experimental conditions

Nuevas estrategias metodológicas mediante iones lantánidos aplicables al análisis de rutina

Time-resolved detection variables. Table 2 also summarizes the optimum values of the time variables involved on this detection mode.

3.3. Features of the method

Calibration graphs were run under the optimum experimental conditions. Table 3 shows the retention time for each quinolone, the calibration parameters and the detection limits (LODs) obtained.

Table 3. Analytical features of the proposed methods

LC-TR						
Analyte	Retention time ⁽¹⁾	Linear range ⁽²⁾	Slope \pm SD	Intercept \pm SD	r	LOD ⁽²⁾
Marbofloxacin	5.12	316-2000	$(1.77 \pm 0.07) \times 10^{-3}$	0.08 ± 0.07	0.9993	95
Ciprofloxacin	6.00	8.1-1500	$(4.05 \pm 0.06) \times 10^{-2}$	0.2 ± 0.1	0.9997	2.4
Danofloxacin	7.05	13-1500	$(5.72 \pm 0.04) \times 10^{-2}$	0.5 ± 0.1	0.9999	3.9
Enrofloxacin	8.18	8.4-1500	$(3.96 \pm 0.02) \times 10^{-2}$	0.4 ± 0.1	0.9999	2.5
Sarafloxacin	13.15	20-2500	$(2.75 \pm 0.08) \times 10^{-2}$	-0.05 ± 0.01	0.9991	7
Difloxacin	14.43	13.9-1200	$(2.88 \pm 0.05) \times 10^{-2}$	0.5 ± 0.1	0.9995	4.2
Oxolinic acid	16.85	13-3000	$(1.88 \pm 0.02) \times 10^{-2}$	0.3 ± 0.3	0.9999	4
Flumequine	18.62	130-3000	$(8.7 \pm 0.1) \times 10^{-3}$	0.09 ± 0.01	0.9996	40
LC-FL						
Analyte	Retention time ⁽¹⁾	Linear range ⁽²⁾	Slope \pm SD	Intercept \pm SD	r	LOD ⁽²⁾
Marbofloxacin	5.12	190-3500	$(1.52 \pm 0.02) \times 10^{-3}$	0.20 ± 0.03	0.9998	60
Ciprofloxacin	6.00	8-3500	$(2.57 \pm 0.02) \times 10^{-2}$	0.09 ± 0.03	0.9998	2
Danofloxacin	7.05	6.2-3500	$(5.01 \pm 0.06) \times 10^{-2}$	0.08 ± 0.05	0.9998	1.9
Enrofloxacin	8.18	7.4-3500	$(2.60 \pm 0.04) \times 10^{-2}$	0.12 ± 0.07	0.9998	2.2
Sarafloxacin	13.15	14-3500	$(1.89 \pm 0.02) \times 10^{-2}$	0.4 ± 0.3	0.9998	3.8
Difloxacin	14.43	12.5-3500	$(2.14 \pm 0.02) \times 10^{-2}$	0.11 ± 0.08	0.9999	4
Oxolinic acid	16.85	7.6-3500	$(5.96 \pm 0.09) \times 10^{-2}$	0.2 ± 0.1	0.9997	2.3
Flumequine	18.62	9-2000	$(8.96 \pm 0.04) \times 10^{-2}$	-0.1 ± 0.1	0.9999	2.7

SD denotes standard deviation; LOD, detection limit

⁽¹⁾ Time is expressed in min

⁽²⁾ All concentrations are expressed in ng ml⁻¹

The *r* values obtained indicate a good correlation of experimental data to the corresponding calibration curve. The LODs, which were calculated following IUPAC recommendations [26], were lower in all instances using the LC-FL method.

The high detection limits obtained for marbofloxacin are due to the relatively low fluorescence intensity of this compound, which justifies that this antibiotic has not been previously determined by monitoring its fluorescence.

The precision of the proposed methods (relative standard deviation) was evaluated using standards at two analyte concentration levels (50 and 500 ng ml⁻¹).

Table 4 shows the results obtained, which were in the ranges 3.7–7.3 % and 1.9–6.8 % for the LC-TR and LC-FL methods, respectively. The sample throughput under the optimum working conditions for the LC methods was approximately of 3 h⁻¹, calculated without taking into account the sample preparation.

Table 4. Study of Precision

Analyte	TR mode		FL mode	
	RSD % (1)		RSD % (1)	
	1 st addition	2 nd addition	1 st addition	2 nd addition
Marbofloxacin	n.s. (2)	4.4	n.s. (2)	2.0
Ciprofloxacin	7.2	5.1	6.5	5.6
Danofloxacin	7.5	5.7	6.8	2.9
Enrofloxacin	7.3	5.6	5.5	4.1
Sarafloxacin	4.7	3.8	6.3	6.2
Difloxacin	5.3	4.8	4.8	4.2
Oxolinic acid	7.8	3.7	4.4	1.9
Flumequine	6.2	4.3	5.2	2.6

(1) From 50 and 500 ng ml⁻¹ for 1st and 2nd addition, respectively

(2) No signal found

3.4. Applications

The LC-FL method was applied to the determination of enrofloxacin, ciprofloxacin, danofloxacin and flumequine, which can be found in milk, in three different samples: whole, semi-skimmed, and skimmed milk. LC-FL was the approach chosen as the LC-TR method did not afford an adequate limit of quantification for flumequine determination in milk samples taking into account its relatively low MRL (50 µg kg⁻¹) [1]. Although marbofloxacin can be

used in animal species producing milk, the determination of this antibiotic cannot be done at any (0.5, 1 and 1.5) MRL. A similar behavior has also been observed in a method described for the separation of five fluoroquinolones [8] in which, although a SPE step was used, the quantification of marbofloxacin could not be done at 0.5 MRL. The other quinolones assayed, such as oxolinic acid, sarafloxacin and difloxacin are not allowed in milk producing species, and therefore, their determination was not carried out in these samples. These compounds were completely resolved from the fluoroquinolones of interest and they did not interfere their determination. Table 5 shows the maximum residue limits (MRL), the decision limit (CC_{α}) and the detection capability (CC_{β}) for ciprofloxacin, danofloxacin, enrofloxacin and flumequine achieved for whole bovine milk, calculated following EC recommendations [2].

Table 5. EC recommendation parameters for whole bovine milk

EC parameter ⁽¹⁾	Ciprofloxacin	Danofloxacin	Enrofloxacin	Flumequine
MRL	100	30	100	50
CC_{α}	109.8	34.6	111.2	52.1
CC_{β}	119.7	39.2	122.4	54.3

MRL denotes maximum residue limits; CC_{α} , decision limit and CC_{β} , detection capability

⁽¹⁾ All concentrations are expressed in $\mu\text{g kg}^{-1}$

Nuevas estrategias metodológicas mediante iones lantánidos aplicables al análisis de rutina

The sample treatment only consisted of a deproteinization step in all instances. The recovery study was performed by preparing three sets, of six samples each one, and adding the analytes at different concentration levels. Table 6 summarizes the concentration found, the standard deviation for each set of samples, and the recoveries obtained.

Table 6. Recoveries of fluoroquinolones added to milk samples using the fluorescence detection mode

Analyte	Milk samples						
	Added ⁽¹⁾	Whole		Semi-skimmed		Skimmed	
		Found ^(1,2)	Recovery (%)	Found ^(1,2)	Recovery (%)	Found ^(1,2)	Recovery (%)
Ciprofloxacin	50	51 ± 2	102.0	51 ± 3	102.0	49 ± 3	98.0
	100	98 ± 6	98.0	97 ± 7	97.0	100 ± 8	100.0
	150	150 ± 10	100.0	150 ± 4	100.0	150 ± 4	100.0
Danofloxacin	20	19 ± 1	95.0	20.8 ± 0.9	104.0	21 ± 2	105.0
	30	31 ± 3	103.3	29 ± 3	96.7	28 ± 2	93.3
	50	51 ± 1	102.0	51 ± 2	102.0	50 ± 1	100.0
Enrofloxacin	50	49 ± 3	98.0	48 ± 2	96.0	53 ± 3	106.0
	100	98 ± 7	98.0	96 ± 6	96.0	98 ± 7	98.0
	150	149 ± 8	99.0	158 ± 8	105.3	143 ± 4	95.3
Flumequine	30	29 ± 2	96.7	30 ± 1	100.7	31 ± 2	104.0
	50	52 ± 1	104.0	50 ± 2	99.0	51 ± 3	101.2
	80	78 ± 6	97.5	81 ± 5	101.3	79 ± 1	98.9

⁽¹⁾Units: $\mu\text{g kg}^{-1}$

⁽²⁾Mean ± S.D. (n =6)

As it can be seen, the recovery values were in the range 93.3 – 106.0 %.

4. FINAL REMARKS

The usefulness of TSL as detection system for the simultaneous determination of eight quinolones is described for the first time. The comparative study carried out using LC techniques with FL and TR detection shows that LC with post-column derivatization and FL detection mode is a selective and sensitive option to determine ciprofloxacin, danofloxacin, enrofloxacin and flumequine in milk samples in the presence of other quinolones. The relatively low quantification limits obtained, which are lower than the MRLs permitted by EU legislation, allow the direct injection of the sample extracts after their deproteinization, without any pre-concentration step. The relatively long emission wavelength of the terbium chelate can help to reduce the interferences from some components of the sample matrix. Thus, the use of SPE to clean up the samples is avoided by this approach and the sample throughput of the system can be enhanced. Although a derivatization step is included, this is automatically performed, which does not affect to the expeditiousness of both LC-FL and LC-TR methods. The LC-FL method has been validated in order to check out its usefulness for the analysis of different milk samples with satisfactory results.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors gratefully acknowledge financial support from the Spanish DGICYT (Dirección General de Investigación del Ministerio de Ciencia y Tecnología) Grant no. BQU2003-03027.

REFERENCES

- [1] Commission Regulation (EC) No 1181/2002 of 1 July 2002 amending Annex I of Council Regulation (EEC) No 2377/90 laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin, O. J., L172 (2002) 13.
- [2] 2002/657/EC Commission Decision of 12 August 2002. Implementing Council Directive 96/23/EC Concerning the Performance of Analytical Methods and the Interpretation of Results, O. J., L221 (2002) 8.
- [3] J. Nouws, H. van Edmond, I. Smulders, G. Loeffen, J. Schouten, H. Stegeman, *Int. Dairy J.*, 9 (1999) 85.
- [4] G.E. Pellegrini, G. Carpico, E. Coni, *Anal. Chim. Acta*, 520 (2004) 13.

- [5] S. Bailac, D. Barrón, V. Sanz-Nebot, J. Barbosa., *J. Sep. Sci.*, 29 (2006) 131.
- [6] B. Toussaint, M. Chedin, G. Bordin, A.R. Rodríguez, *J. Chromatogr. A*, 1088 (2005) 32.
- [7] N. Van Hoof, K. De Wasch, L. Okerman, W. Reybroeck, S. Poelmans, H. Noppe, H. De Brabander. *Anal. Chim. Acta.* 529 (2005) 265.
- [8] M.C. Marazuela, M.C. Moreno-Bondi, *J. Chromatogr. A*, 1034 (2004) 25.
- [9] A.L. Cinquina, P. Roberti, L. Giannetti, F. Longo, R. Draisci, A. Fagiolo, N.R. Brizioli, *J. Chromatogr. A*, 987 (2003) 221.
- [10] C. Ho, D.W.M. Sin, H.P.O. Tang, L.P.K. Chung, S.M.P. Siu. *J. Chromatogr. A*, 1061 (2004) 123.
- [11] B. Roudaut, J.C. Yorke, *J. Chromatogr. B*, 780 (2002) 481.
- [12] J.C. Yorke, P. Froc, *J. Chromatogr. A*, 882 (2000) 63.
- [13] M. Ramos, A. Aranda, E. García, T. Reuvers, H. Hooghuis, *J. Chromatogr. B*, 789 (2003) 373.
- [14] R.J. Maxwell, E. Cohen, *J. High Resol. Chromatogr.*, 21 (1998) 241.
- [15] G. Yang, B. Lin, Z. Zeng, Z. Chen, X. Huang, *J. AOAC Int.*, 88 (2005) 1688.
- [16] E. Verdon, P. Couedor, B. Roudaut, P. Sanders, *J. AOAC Int.*, 88 (2005) 1179.

- [17] A. Gómez-Hens, M.P. Aguilar-Caballo, Trends Anal. Chem., 21 (2002) 131.
- [18] R.C. Rodríguez-Díaz, M.P. Aguilar-Caballo, A. Gómez-Hens, Anal. Lett., 37 (2004) 1163.
- [19] X. Wu, J. Yang, D. Ran, C. Guo, S. Sun, J. Zhen, L. Xu, Anal. Lett., 38 (2005) 2345.
- [20] R.C. Rodríguez-Díaz, M.P. Aguilar-Caballo, A. Gómez-Hens, Anal. Chim. Acta, 494 (2003) 55.
- [21] E.J. Llorent-Martínez, P. Ortega-Barrales, A. Molina-Díaz, Anal. Biochem., 347 (2002) 330.
- [22] E.J. Llorent-Martínez, J.F. García-Reyes, P. Ortega-Barrales, A. Díaz-Molina, Anal. Chim. Acta, 532 (2005) 159.
- [23] J.A. Hernández-Arteseros, R. Compañó, R. Ferrer, M.D. Prat, Analyst, 125 (2000) 1155.
- [24] J.A. Hernández-Arteseros, R. Compañó, M.D. Prat, Analyst, 123 (1998) 2729.
- [25] A. Rieutord, P. Prognon, F. Brion, G. Mahuzier, Analyst, 122 (1997) 59R.
- [26] G.L. Long, J.D. Winefordner, Anal. Chem. 55 (1983) 712A.

**II.7. DETERMINATION OF HYDROXYBENZOIC ACIDS AND
CATECHINS IN WHITE WINE SAMPLES BY LIQUID
CHROMATOGRAPHY WITH LUMINESCENCE
DETECTION**

Trabajo enviado a la revista "Journal of Separation
Science".

Nuevas estrategias metodológicas mediante iones lantánidos aplicables al análisis de rutina

**DETERMINATION OF HYDROXYBENZOIC ACIDS AND
CATECHINS IN WHITE WINE SAMPLES BY LIQUID
CHROMATOGRAPHY WITH LUMINESCENCE DETECTION**

*Rafael Carlos Rodríguez-Díaz, María Paz Aguilar-Caballos,
Agustina Gómez-Hens**

*Department of Analytical Chemistry. "Marie Curie Annex" building. Campus
of Rabanales. University of Córdoba, E-14071 Córdoba, Spain.*

ABSTRACT

A liquid chromatographic method with luminescence detection for the determination of eight phenolic compounds is reported. The method involves post-column derivatization with terbium(III). This derivatization is based on the reaction between phenolics and terbium(III) to form luminescent chelates, which were determined at λ_{ex} 295, λ_{em} 545 nm using the fluorescence mode. The long wavelength emission of lanthanide chelates can minimize interferences from background sample matrix, which usually emit at shorter wavelengths. Also, the chromatographic separation allows the individual determination of phenolics, which cannot be done using the direct measurement of the fluorescence of their

corresponding terbium chelates. Dynamic ranges of the calibration graphs and detection limits, obtained with standard solutions of analytes were ($\mu\text{g ml}^{-1}$) : gallic acid (0.9-40, 0.3), protocatechuic acid (0.05-7, 0.016), catechin (0.2-40, 0.07), vanillic acid (0.25-40, 0.08), p-hydroxybenzoic acid (0.8-40, 0.25), syringic acid (0.17-40, 0.05), epicatechin (0.3-40, 0.09) and salicylic acid (0.07-12, 0.02). The precision was established at two concentration levels of each analyte and expressed as the percentage of relative standard deviation with values ranged between 1.0 and 6.5 %. The practical usefulness of the method was demonstrated by the analysis of white wine samples, which were diluted two-fold and directly injected into the chromatographic system. The recovery values obtained ranged between 93.3 % and 108.0%.

Keywords: catechins, derivatization, hydroxybenzoic acids, liquid chromatography, terbium(III)

1. INTRODUCTION

Phenolic compounds are a group of biologically active compounds, which are involved in many metabolic routes of plants [1]. This is a heterogeneous group constituted by catechins, anthocyanidins, tannins, flavonones, flavones, flavonols and hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acids, among others. These compounds present antioxidant properties, which are thought to be related with a reduction in the risks of coronary or cancer diseases, thus having a direct incidence on human health. Phenolics can be present in different products from plant origin, like fruit juices [2-4], olive oil [5] and red or white wines [6-16]. The composition and amount of each compound depends on the sample and also for a given sample, of several factors, such as origin of raw material, elaboration process and storage conditions.

Phenolics are also the main responsible of wine colour, aroma and taste. They are present in relatively high concentration in red wines, but their presence is also significant in white wines [6]. Mixtures of these compounds in red and white wine samples are usually determined by liquid chromatography (LC) with UV [6-15], fluorimetric [11,12] or mass spectrometry [16] detection. These methods usually involve a chromatographic separation using

reverse-phase liquid chromatography (RP-LC) with conventional C18 columns and, some of them, a previous solid-phase extraction (SPE) step to remove or minimise interferences from sample matrix [9,10,14]. More recently, it has been reported the determination of phenolics in ciders by direct injection [17] using conventional C18 columns.

Lanthanide-sensitised luminescence is a sensitive technique, which has been widely used for the determination of organic species [18]. The luminescence of lanthanide chelates arises from an intramolecular energy transfer from the excited triplet state of the ligand to the resonance level of the emitting ion. The determination of benzoic [19] and salicylic [20] acids have been previously reported using terbium(III) as reagent. It was found that benzoic acid, which only has the aromatic carboxylic acid group available for the terbium chelation, exhibited the highest luminescence intensity at a mild acidic pH. Under these conditions, benzoic acid was totally deprotonated and it was able to react to terbium(III) ions. The presence of tri n-octylphosphine oxide (TOPO) was necessary to replace water molecules from the coordination sphere of lanthanide ion, which is logical taking into account its high coordination number. However, salicylate has two different moieties, the carboxylic acid and hydroxyl- group, susceptibles of chelating terbium. Therefore, it

acts as a multidentate ligand when the pH of the medium is alkaline enough for the hydroxyl- group be deprotonated. In this case, the addition of a complexone, such as ethylenediaminetetracetic acid (EDTA), is necessary to avoid terbium(III) precipitation at such a high pH. Although p-hydroxybenzoic acid has been also determined using terbium as reagent [18] the use of sensitised luminescence has been scarcely reported up to date for the determination of phenolics.

The work presented here reports the usefulness of sensitised luminescence for the luminescent detection of eight phenolics in white wine samples using RP-LC. This method allows the selective determination of eight hydroxybenzoic acids and catechins in white wine samples. The similar luminescent behaviour of some of these compounds makes necessary the use of a separation technique to quantify them. The detection limits obtained were suitable to carry out the determination of these compounds by the direct injection of the sample diluted two-fold. The use of a solid-phase extraction (SPE) step was not required as there was not any interference from sample matrix at the retention time of the analytes. The method was validated by performing the recovery study at three different concentration levels of the analytes. The results obtained demonstrated the practical usefulness of the method to the direct analysis of white wine samples.

2. Experimental

2.1. Instrumental

Chromatographic separation was performed on a modular liquid system integrated by a PU-2089 Plus Jasco (Jasco, Tokyo, Japan) high-pressure quaternary pump, a 7125 Rheodyne (Cotati, CA, USA) high-pressure manual injection valve with a 20- μ l injection loop, and a Synergi Fusion-RP-80A column (Phenomenex, USA) of 250 mm x 4.6 mm id, 4 μ m. A Gilson (Villiers-le-Bel, France) Minipuls-3 low pressure peristaltic pump and Omnifit (Cambridge, UK) Teflon tubing of 0.5 mm id were used for constructing the post-column derivatisation manifold. An SLM Aminco (Urbana, IL, USA) AB2 luminescence spectrometer, provided with a 150 W continuous xenon lamp and a 7 W pulsed xenon lamp, equipped with a 176-052-QS Hellma (Hellma Hispania, Barcelona, Spain) flow-cell, with an inner volume of 18 μ l, was used. Excitation and emission slits were set to provide 8 nm band-widths.

2.2. Reagents

All reagents used were of analytical grade. Gallic, protocatechuic, vanillic and p-hydroxybenzoic acids, as well as catechin and

epicatechin, were supplied by Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Syringic acid was purchased from Fluka (Buchs, Switzerland). Salicylic acid was provided by Aldrich (Gillingham, Dorset, UK). Stock solutions of analytes (1000 mg L^{-1}) were prepared in methanol and stored at $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ in the dark. These solutions were stable for two weeks. Working solutions were daily prepared in doubly deionized water. The post-column derivatization reagent consisted of 10 mM terbium(III) prepared by dissolving the appropriate amount of terbium(III) nitrate pentahydrate (Aldrich, Gillingham, Dorset, UK) in a solution containing 30 mM ethylenediaminetetraacetic (EDTA) acid (Merck, Darmstadt, Germany) and 140 mM sodium hydroxide (Merck, Darmstadt, Germany). The mobile phase was obtained by mixing solvents A [methanol:acetic acid (0.2%, pH 3.0) (10:90)] and B [methanol:acetic acid (0.2%, pH 3.4) (90:10)] and using a step gradient program.

2.3. Procedures

2.3.1. Chromatographic determination of free phenolics

The RP-LC separation was carried out using a C18 column and a gradient program with mixtures of methanol and acetic acid, according to Table 1, at a flow-rate of 0.8 ml min^{-1} .

Table 1. Gradient elution conditions

Time, min	A(%)	B(%)
0	100	0
30	85	15
60	50	50
62	100	0

A: Methanol:acetic acid (0.2%, pH 3.0) (10:90)

B: Methanol:acetic acid (0.2%, pH 3.4) (90:10)

Standards or samples, at final concentrations within the dynamic ranges of the calibration curve for each analyte, were introduced into the chromatographic system by means of an injection valve with a 20- μ l injection loop. The eluent was merged with the derivatization reagent pumped at a flow-rate of 0.46 ml min⁻¹. The mixed solution was passed through Teflon tubing, in which the derivatization reaction took place. Finally, the fluorescence signal was monitored at λ_{ex} 295 and λ_{em} 545 nm, subtracting the corresponding blank solution. Chromatograms were taken using the original software of the luminescence spectrometer and the raw data of fluorescence intensity and time were exported and treated using Origin 7 software for the calculation of peak areas.

2.3.2. *Analysis of white wine samples*

White wine samples were diluted (1 + 1) with bidistilled water and were directly injected onto the chromatographic system and treated following the procedure above indicated. Each determination was the mean of three measurements.

3. Results and Discussion

3.1. *Characterization of the luminescent system*

Although phenolic compounds exhibit intrinsic fluorescence (Table 2), the formation of terbium chelates was investigated due to the advantageous features of lanthanide-sensitised luminescence. The relatively long emission of these chelates would allow the elimination of some potential background interferences from sample matrix, which could not be separated from the analytes of interest, and that usually emit at shorter wavelengths. As can be seen from Table 2, intrinsic excitation and emission wavelengths are different from each compound, what make the most sensitive individual detection difficult when a conventional detector is used, since a compromise detection wavelength has to be selected. The use of

terbium as reagent allows to use a single emission wavelength (545 nm), which is common to all chelates.

Table 2. Intrinsic excitation and emission wavelengths of phenolics

Compound	Excitation	Emission
Gallic acid	291	359
Protocatechuic acid	297	353
Catechin	283	311
Vanillic acid	295	351
p-hydroxybenzoic acid	277	310
Syringic acid	292	355
Epicatechin	283	313
Salicylic acid	299	405

The excitation wavelength used was selected by performing chromatograms at 284 and 295 nm. In general, the best option for the simultaneous detection of the analytes was achieved by exciting at 295 nm. The selection of the experimental conditions for the

development of the luminescent system was done by assaying the influence of the medium on the signal of each phenolic compound. Figure 1 shows the chemical structures of the analytes and it can be seen, for instance, that some compounds, such as salicylic, protocatechuic, vanillic, gallic, p-hydroxybenzoic and syringic acids have at least two moieties available for chelating terbium. Also, the presence of aromatic carboxylic acid groups allows their reaction in mild acidic medium in the same way as benzoic acid [19]. Opositely, catechin and epicatechin only have hydroxyl- groups for the chelate formation, which made necessary the use of an alkaline medium for the deprotonation of these hydroxy- groups to be capable of reacting to terbium(III).

As it has been mentioned before, the addition of EDTA was needed to prevent terbium(III) precipitation. It has been reported previously [20] that the use of cethyltrimethylammonium bromide increases the luminescence obtained for salicylic acid. The influence of this surfactant was investigated below and above its critical micellar concentration (cmc) finding that at low concentrations did not have any influence on the luminescent signal, while a precipitate was obtained above its cmc. TOPO was also assayed in the range 10-60 μM , but any improvement in the luminescent signal was observed.

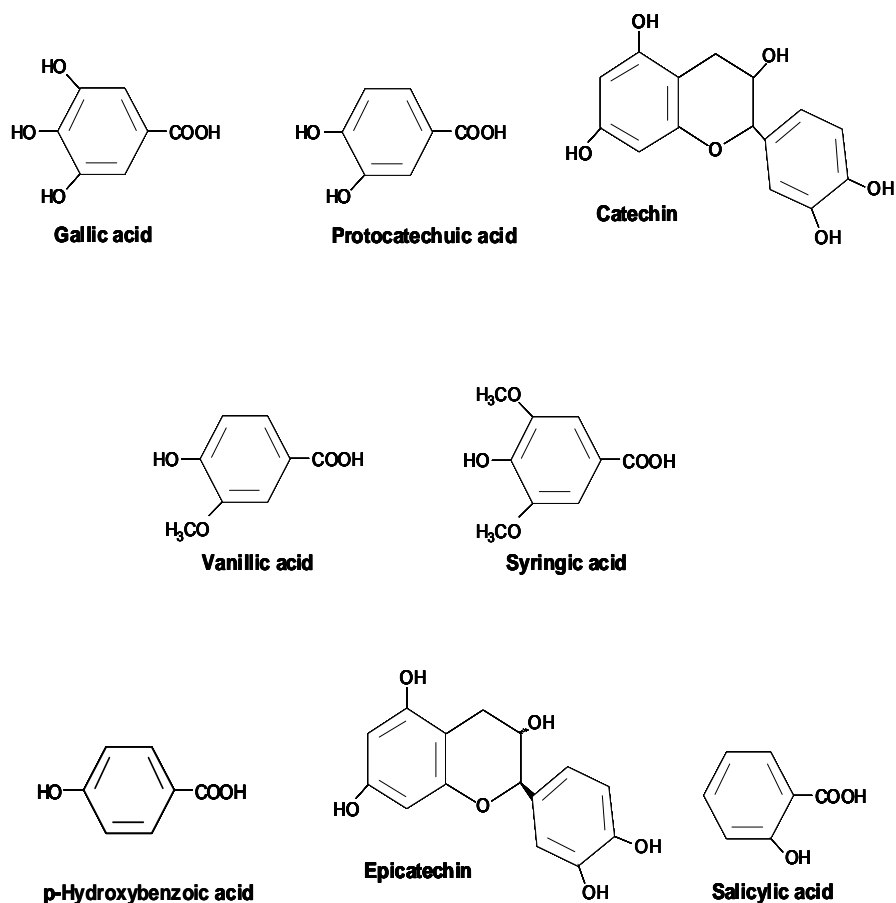


Figure 1. Chemical structure of the assayed phenolic compounds

3.2. Optimization of the system

Chromatographic separation. The choice of the initial composition of the mobile phase composed by methanol: acetic acid was done according to those previously described for the separation of different

mixtures of these compounds [9,11,12,14]. The influence of the flow-rate was studied in the range 0.6-1.0 ml min⁻¹. At the lowest flow-rate, the peaks exhibited relatively long retention times while the use of 1.0 ml min⁻¹ afforded a quite elevated pressure. A flow-rate of 0.8 ml min⁻¹ was chosen as the optimum value for the development of the method. Different methanol: acid solution mixtures were assayed for the separation of the analytes using isocratic and gradient programs. Several acids, such as formic [13,15], orthophosphoric [7,8] and acetic [6,9,11,12,14] acids have been proposed to provide the acidic medium to have the analytes in a protonated form. Acetic acid was chosen for the development of the method, because the other acids, in special orthophosphoric acid, are susceptible of precipitating terbium ions [21]. The optimum pH of the mobile phase was studied and it was found that the peak selectivity was better using 3.0 and 3.4 as apparent pH for solvents A and B. The use of RP-LC implies mobile phases with a high content of water, which is a known quencher of lanthanide-sensitised luminescence owing to the vibration of -OH groups. The influence of acetate ions was studied as they can help to remove water molecules from the coordination sphere of the lanthanide ion. The range evaluated was 0.1-2%, finding a good separation from 0.2%. This concentration was chosen as the optimum value since it allowed the increase of the pH towards alkaline values to obtain an adequate luminescence signal when the

eluent was merged with the derivatizing reagent. The gradient program described in Table 1 was finally used as it allowed an adequate separation of the phenolic compounds in the lowest possible retention time. Under these chromatographic conditions, the separation of the analytes was done in less than 60 minutes. This behaviour is similar to that reported by other methods developed for phenolic acids [6,9,14,15] using conventional C18 columns.

Post-column derivatization. The study of the flow-rate of the derivatizing reagent solution was done in order to provide the best chromatographic eluent/derivatization reagent ratio. It showed that 0.46 ml min^{-1} was the optimum value when 0.8 ml min^{-1} was used for the chromatographic separation. Flow-rates higher than 1.2 ml min^{-1} caused overpressure at the mixing point and backflowing into the chromatographic column. The length of the reactor used for the formation of terbium chelates was evaluated to allow an adequate residence time for the derivatization mixture. Dispersion phenomena, which are present in flow systems and can decrease the separation efficiency, were observable using reactors longer than 50 cm. The alkaline medium necessary for the terbium chelation by some of these compounds, made necessary the use of EDTA to prevent terbium hydroxide precipitation. Thus, the apparent pH of the medium was studied by adding sodium hydroxide to the terbium

solution in the range 10-300 mM, finding that the optimum pH of the derivatizing reagent was 13.20, obtained using 140 mM sodium hydroxide. EDTA concentration was studied to achieve a derivatizing reagent solution stable with time at this high pH value. Terbium precipitation was observed at EDTA concentrations lower than 10 mM, but it was avoided using 30 mM EDTA. Above this concentration, a slight decrease in the luminescence of the chelates was observed. Figure 2 shows the influence of terbium(III) concentration for each phenolic compound. The optimum terbium concentration chosen was 10 mM.

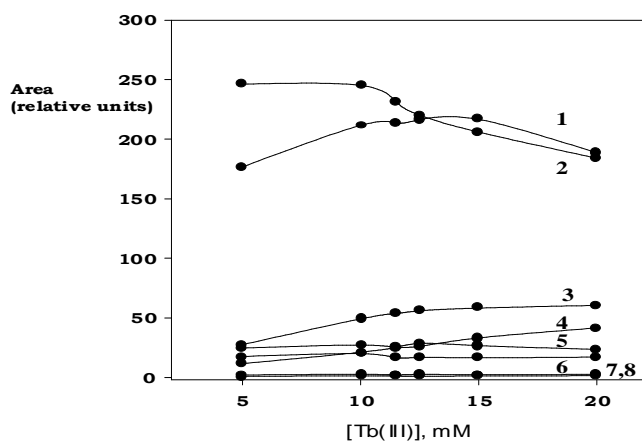


Figure 2. Influence of terbium(III) concentration on the peak area for 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of (1) salicylic acid, (2) protocatechuic acid, (3) syringic acid, (4) vanillic acid, (5) epicatechin, (6) catechin, (7) p-hydroxybenzoic acid and (8) gallic acid, under optimum experimental conditions

3.3. Analytical features

Calibration graphs were run under the optimum experimental conditions. Table 3 shows the retention time, the calibration parameters and the detection limit (LODs) obtained for each phenolic.

Table 3. Analytical features of the determination of phenolics

Analyte	Retention time ^a , min (%RSD)	Linear range ^b	Slope \pm SD	Intercept \pm SD	r	LOD ^b
Gallic acid	9.23 (1)	0.9-40	0.27 \pm 0.01	0.02 \pm 0.01	0.996	0.3
Protocatechuic acid	17.7 (2.6)	0.05-7	49.0 \pm 0.5	0.5 \pm 0.3	0.999	0.016
Catechin	28.8 (2.4)	0.2-40	3.94 \pm 0.05	-0.011 \pm 0.004	0.999	0.07
Vanillic acid	35.9 (1.8)	0.25-40	4.48 \pm 0.07	0.6 \pm 0.2	0.999	0.08
p-hydroxybenzoic acid	38.2 (1.3)	0.8-40	0.55 \pm 0.03	-0.12 \pm 0.03	0.997	0.25
Syringic acid	40.9 (1.5)	0.17-40	9.7 \pm 0.7	0.015 \pm 0.008	0.993	0.05
Epicatechin	43.4 (1.5)	0.3-40	5.4 \pm 0.1	0.42 \pm 0.9	0.999	0.09
Salicylic acid	57.8 (1.2)	0.07-12	42.2 \pm 0.9	0.9 \pm 0.2	0.999	0.02

^a(n=9, inter-day)
^bUnits: $\mu\text{g ml}^{-1}$

The *r* values obtained indicate a good correlation of experimental data to the corresponding calibration curve. The LODs, which were calculated following IUPAC recommendations [22] were comparable or, in some instances, lower than those obtained by other LC methods with UV [7-9, 12, 14] or fluorimetric detection [12]. The precision of the proposed methods (relative standard deviation) was evaluated using standards at two analyte concentration levels (0.5 and 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ for most compounds, excepting gallic and *p*-hydroxybenzoic acids, which were 2 and 3 $\mu\text{g ml}^{-1}$ respectively). Table 4 shows the results obtained, which were in the range 1% – 6.5 %.

Table 4. Precision of the proposed method

Compound	%RSD	
	1 st addition ^a	2 nd addition
Gallic acid	6.0	6.3
Protocatechuic acid	1.0	2.1
Catechin	4.0	3.5
Vanillic acid	3.5	2.4
<i>p</i> -hydroxybenzoic acid	4.7	4.0
Syringic acid	2.2	4.3
Epicatechin	6.5	3.8
Salicylic acid	5.3	5.1

^afirst addition was 0.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ for most compounds, excepting for gallic acid (2 $\mu\text{g ml}^{-1}$) and *p*-hydroxybenzoic acid (3 $\mu\text{g ml}^{-1}$); the second addition was 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ in all instances

3.4. Applications

The proposed method was applied to the analysis of two different white wine samples, which were two-fold diluted with doubly deionized water and directly injected into the chromatographic system. It was necessary a cleaning step of the column with methanol for 10 min and then, the column was equilibrated for 5 min using the initial composition of the mobile phase.

Figure 3 shows the chromatograms for the sample 1 two-fold diluted (3.A) without spiking and after addition of $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ of protocatechuic and salicylic acids and $20 \mu\text{g ml}^{-1}$ for the other phenolics (3.B). It can be seen that two peaks from unknown compounds appeared in these chromatograms, which were not further identified, but they were completely resolved from those of analytes. This confirms the adequate selectivity of the proposed LC method with post-column derivatization for the analysis of these phenolics in white wine samples.

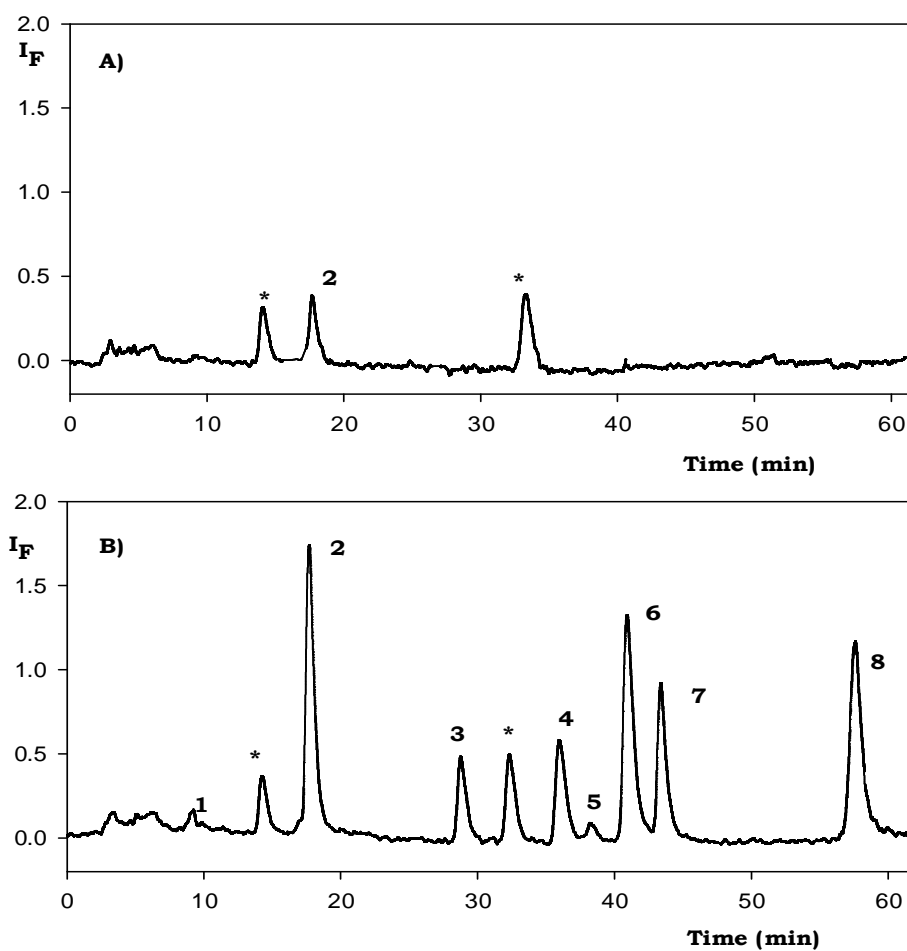


Figure 3. Chromatogram obtained for (A) blank of sample 1 and (b) spiked sample at $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ of protocathechuic and salicylic acids and $20 \mu\text{g ml}^{-1}$ for the other phenolics. (1) gallic acid, (2) protocathechuic acid, (3) catechin, (4) vanillic acid, (5) p-hydroxybenzoic acid, (6) syringic acid, (7) epicatechin, (8) salicylic acid. Peaks marked with * correspond to unidentified components of the sample

Table 5 shows the analyte content in the two samples, in which can be seen that only protocatechuic acid was found in both samples while salicylic acid was present only in sample 2.

This table also shows recovery data, which were calculated by adding three different amounts of each phenolic to the sample and subtracting the results obtained for similarly prepared unspiked samples (Table 5).

Each analysis was performed in triplicate. The recoveries obtained were in the range 93.3-108.0 %.

Table 5. Analysis of white wine samples

Compound	Wine 1				Wine 2			
	Content ^a ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Recovery study			Content ^a ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Recovery study		
		Added ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Found ^b ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Recovery (%)		Added ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Found ^b ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Recovery (%)
Gallic acid	---	2	2.16±0.09	108.0	---	2	2.12 ± 0.07	106.0
		3	3.2 ± 0.2	106.7		3	2.9 ± 0.1	97.7
		20	19.9 ± 1.1	99.5		20	20.2 ± 1.3	101.1
Protocatechuic acid	0.83 ± 0.04				0.31±0.02			
		1	0.96 ± 0.04	96.0		1	1.06 ± 0.07	106
		3	3.1 ± 0.1	103.0		3	2.9 ± 0.1	96.7
		5	4.8 ± 0.1	96.0		5	4.98 ± 0.3	99.6
Catechin	---				---			
		1	1.04 ± 0.04	104.0		1	1.06 ± 0.05	106.0
		3	3.08 ± 0.12	102.7		3	2.88 ± 0.04	96.0
		20	19.96±0.04	99.8		20	19.8 ± 1.2	99.0
Vanillic acid	---				---			
		1	0.94 ± 0.07	94.0		1	0.98 ± 0.06	98.0
		3	2.99 ± 0.01	99.7		3	2.94 ± 0.04	98.0
		20	19.2 ± 1.1	96.0		20	19.8 ± 0.6	99.0
p-hydroxybenzoic acid	---				---			
		2	1.99 ± 0.11	99.5		2	2.06 ± 0.14	103.0
		15	15.02± 0.04	100.1		15	14 ± 0.2	93.3
		20	19.8 ± 0.8	99.0		20	19 ± 0.6	95.0
Syringic acid	---				---			
		1	0.94 ± 0.04	94.0		1	0.96 ± 0.06	96.0
		3	2.99 ± 0.14	99.7		3	3.02 ± 0.2	100.7
		20	19.3 ± 1.2	96.5		20	19.6 ± 0.7	98.0
Epicatechin	---				---			
		1	0.94 ± 0.07	94.0		1	0.99 ± 0.07	99.0
		3	2.94 ± 0.15	98.0		3	3.2 ± 0.2	106.7
		20	20.3 ± 1.1	101.5		20	20.8 ± 0.7	104.1
Salicylic acid	---				0.22±0.02			
		1	0.98 ± 0.06	98.0		1	1 ± 0.07	100.0
		3	2.92 ± 0.01	97.3		3	3.08 ± 0.12	102.7
		5	5.2 ± 0.4	104.0		5	4.8 ± 0.02	96.0

Mean ± S.D. (n = 3)

4. CONCLUSIONS

The usefulness of terbium-sensitised luminescence for the determination of eight phenolic compounds in white wine samples is described for the first time. The relatively long emission wavelength of the terbium chelates can partially help to reduce the interference from some components of the sample matrix. The use of the LC separation allows the simultaneous determination of each individual analyte and the analysis of white wine samples without any further clean-up step.

ACKNOWLEDGEMENT

Authors gratefully acknowledge financial support from the Spanish MCyT (Ministerio de Ciencia y Tecnología) Grant No BQU2003-03027.

REFERENCES

- [1] Belitz, H.D., Grosch, W., *Food Chemistry*, Springer-Verlag, Heidelberg, 1987.
- [2] Sharhzad, S., Birsch, I., *J. Chromatogr. A* 1996, 741, 223-231.

-
- [3] Schieber, A., Keller, P., Carle, R., *J. Chromatogr. A* 2001, 910, 265-273.
- [4] Sánchez-Rabameda, F., Jáuregui, O., Lamuela-Raventós, R.M., Viladomat, F., Bastida, J., Codina, C., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2004, 15, 553-563.
- [5] Bendini, A., Bonoli, M., Cerretani, L., Biguzzi, B., Lercker, G., Gallina-Toschi, T., *J. Chromatogr. A* 2003, 985, 425-433.
- [6] Proestos, C., Bakogiannis, A., Psarianos, C., Koutinas, A.A., Kanellaki, M., Komaitis, M., *Food Control* 2005, 16, 319-323.
- [7] Sladkovský, R., Solich, P, Urbánek, M., *J. Chromatogr. A* 2004, 1040, 179-184.
- [8] Castellari, M., Sartini, E., Fabiani, A., Arfelli, G., Amati, A., *J. Chromatogr. A* 2002, 973, 221-227.
- [9] Álamo, M. del, Casado, L., Hernández, V., Jiménez, J.J., *J. Chromatogr. A* 2004, 1094, 97-105.
- [10] Kerem, Z., Bravdo, B., Shoseyov, O., Tugendhaft, Y., *J. Chromatogr. A* 2004, 1052, 211-215.
- [11] Rodríguez-Delgado, M.A., González-Hernández, G., Conde-González, J.E., Pérez-Trujillo, J.P., *Food Chem.* 2002, 78, 523-532.
- [12] Rodríguez-Delgado, M.A., Malovaná, S., Pérez, J.P., Borges, T., García-Montelongo, F.J., *J. Chromatogr. A*, 2001, 912, 249-257.

- [13] Silva, L.R., Andrade, P.B., Valentao, P., Seabra, R.M., Trujillo, M.E., Velázquez, E., *Food Chem.* 2005, 89, 185-189.
- [14] Álamo-Sanza, M. Del, Nevares-Domínguez, I., Cárcel-Cárcel, L.M., Navas-Gracia, L., *Anal. Chim. Acta* 2004, 513, 229-237.
- [15] Robbins, R.J., Bean, S.R., *J. Chromatogr. A* 2004, 1038, 97-105.
- [16] Loredana-La Torre, G., Saitta, M., Vilasi, F., Pellicanó, T., Dugo, G., *Food Chem.* 2006, 94, 640-650.
- [17] Suárez, B., Palacios, N., Fraga, N., Rodríguez, R., *J. Chromatogr. A* 2005, 1066, 105-110.
- [18] Gómez-Hens A., Aguilar-Caballos M.P., *Trends Anal. Chem.* 2002, 21, 131-141.
- [19] Aguilar-Caballos, M.P., Gómez-Hens, A., Pérez-Bendito, D., *Analyst* 1999, 124, 1079-1084.
- [20] Panadero, S., Gómez-Hens, A., Pérez-Bendito, D. *Anal. Chim. Acta*, 1996, 329, 135-141.
- [21] Rieutord, A., Prognon, P., Brion, F., Mahuzier, G. *Analyst* 1997, 122, 59R-66R.
- [22] Long, G.L., Winefordner, J.D. *Anal. Chem.* 1983, 55, 712A-714A.

CAPÍTULO III

Nuevas estrategias metodológicas mediante iones lantánidos aplicables al análisis de rutina

CAPÍTULO III

USO DE LANTÁNIDOS A LARGA LONGITUD DE ONDA

III.1. Introducción

III.2. Equipos y materiales

III.3. Procedimientos

III.4. Usefulness of ytterbium(III) as analytical reagent for total sulfite determination in white wine samples

III.5. Determination of soluble phosphates in water samples using ytterbium(III) and dynamic measurements of light scattering intensity at long wavelength

Nuevas estrategias metodológicas mediante iones lantánidos aplicables al análisis de rutina

En este capítulo se incluyen los trabajos de investigación en los que propone el uso de iterbio(III) como reactivo analítico para la determinación de los aniones sulfitos y fosfatos. La metodología utilizada consiste en la realización de medidas de dispersión de la radiación a larga longitud de onda. En la introducción de este capítulo se comentan diversos aspectos relacionados con el trabajo de investigación desarrollado y, a continuación, se describen el equipo, los materiales utilizados y los procedimientos desarrollados.

III.1. INTRODUCCIÓN

Se exponen de forma breve algunos conceptos fundamentales de los fenómenos de dispersión de la radiación originados por partículas de pequeño tamaño, las técnicas analíticas más utilizadas para su medida y sus aplicaciones más recientes. También se discuten las ventajas que aporta la utilización de la metodología cinética en medidas de dispersión, mediante la técnica de mezcla de flujo detenido. Debido a que se ha utilizado un método multivariante para la optimización del sistema para fosfatos, se incluyen algunos aspectos básicos sobre esta optimización. Por último, se comenta sucintamente el estado actual de las metodologías disponibles para sulfitos y fosfatos.

III.1.1. Dispersión de la radiación

Cuando la radiación luminosa atraviesa un medio transparente en el que existe una suspensión de partículas sólidas, se dispersa en todas direcciones y, como consecuencia, se observa turbia. Desde el punto de vista analítico, la dispersión es una de las principales fuentes de interferencias en espectrofotometría y espectrofluorimetría, aunque puede minimizarse realizando medidas a baja temperatura o mediante tratamientos matemáticos.

La aplicación directa de la teoría electromagnética de la dispersión, que ha sido estudiada por Mie, resulta bastante compleja, por lo que suelen utilizarse algunas simplificaciones. Pueden distinguirse diferentes fenómenos de dispersión, dependiendo del tamaño de las partículas (d) y de la longitud de onda de la radiación incidente (λ_0). La dispersión Rayleigh ($d < 0.5 \lambda_0$) la originan partículas cuyo diámetro medio es menor que la longitud de onda de la radiación, produciéndose una dispersión casi simétrica. Conforme aumenta el tamaño de la partícula, la radiación dispersada se desplaza en el sentido de la radiación transmitida, dando lugar a las dispersiones Tyndall ($d \approx \lambda_0$) y Mie ($d \gg \lambda_0$). Existen otros fenómenos en los que, además de la dispersión, se

produce un cambio en la frecuencia de la radiación, como ocurre en el efecto Raman.

Las dos técnicas analíticas convencionales basadas en el fenómeno de dispersión sin cambio de frecuencia son la turbidimetría y la nefelometría. Ambas difieren en la manera de medir la dispersión de la radiación. En turbidimetría se obtiene la relación entre la intensidad de la radiación transmitida y la intensidad de la radiación incidente, mientras que en nefelometría se mide la radiación dispersada que forma un ángulo, generalmente de 90°, con respecto a la radiación incidente. No obstante, este ángulo de observación no es normalmente el óptimo, ya que se consiguen mejoras notables en la sensibilidad cuando se seleccionan ángulos tan pequeños como es instrumentalmente posible. Generalmente, se consiguen mejores límites de detección con nefelometría que con turbidimetría.

Estas técnicas de dispersión se usan ampliamente en el laboratorio clínico. Así, es frecuente la utilización de la inmunoturbidimetría para la determinación, entre otras especies, de ferritina [1], transferrina y capacidad total de enlace de hierro [2,3], fenitoína [4] y fibrina soluble [5]. Otra área de aplicación es en el control de contaminación ambiental [6], usándose en los

tratamientos para controlar la calidad del agua, ya sea natural, residual o potable.

En los últimos años se ha desarrollado una técnica denominada dispersión de la radiación de resonancia (Resonance Light Scattering, RLS), en las que las medidas de dispersión se obtienen con un espectrofluorímetro convencional. Esta técnica mide la dispersión basada no sólo en fenómenos Rayleigh, sino también la debida a agregados moleculares formados por una sustancia absorbente, denominada cromóforo, y el analito [7]. También pueden utilizarse partículas de metales como oro y plata con tamaños en el intervalo 40-120 nm [8-11].

Las aplicaciones más relevantes de esta técnica han estado orientadas al análisis bioquímico y farmacéutico para la determinación de fármacos [12], proteínas [13] y ácidos nucleicos [14,15]. En la Tabla 1 se resumen algunas características de algunos métodos desarrollados.

Tabla 1. Características analíticas de métodos basados en RLS para la determinación de especies de interés bioquímico

Compuestos ^a	pH	λ^b	Intervalo lineal ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	LOD (ng ml^{-1})	Referencia
Heparina, azul victoria	5.0-7.6	523	0-0.4	3.35	[12]
Heparina, azul de metileno	5.0-6.0	534	0-0.4	6.62	[12]
Albúmina, rojo de pirogalol	3.6-4.2	347	0.25-13	51	[13]
Ácidos nucleicos, histona	4.5-6.5	551	0.5-1.5	2.0	[14]
Ácidos nucleicos, morina	7.30	462	0.0075-10	3.4	[15]
Glucógeno, concavalina A	7.4	400	0.32-24	---	[16]
Tiamina, SDBS ^c	3.29	375	0.12-0.8	0.12	[17]

^aAnalito, reactivo.^bLongitud de onda de máxima intensidad RLS^cDodecibenceno sulfonato sódico

La RLS también se ha utilizado en inmunoensayo como sistema de detección, mediante el uso de partículas de oro o plata como marcador para la determinación de especies de interés biológico [18]. Estas partículas presentan absorción en la región visible. Debido a la dependencia de este fenómeno con el tamaño de partícula, se produce un desplazamiento batocrómico cuando el tamaño aumenta. Se han descrito aplicaciones de estas partículas en estudios de hibridación de ácidos nucleicos y de diagnóstico genético [19,20]. La utilización de fuentes de radiación más

energéticas, como láseres [21,22], contribuye a ampliar la aplicabilidad de este tipo de inmunoensayos en el ámbito de la biología molecular y celular.

Como puede observarse en la Tabla 1, las medidas se realizan en la zona visible del espectro, en la que pueden producirse señales debidas a la matriz de la muestra y que pueden interferir en las determinaciones propuestas. Se ha propuesto la realización de medidas de dispersión a larga longitud de onda para mejorar la selectividad de las determinaciones [7], aunque no se ha descrito aún ninguna aplicación analítica.

III.1.2. Discriminación temporal mediante medidas dinámicas

La utilización de la metodología cinética con fines analíticos experimentó un notable incremento a partir del desarrollo de sistemas electrónicos e informáticos para la adquisición automática de datos a medida que se desarrolla el sistema químico implicado. Asimismo, factores tales como el desarrollo de instrumentos estables para medidas luminiscentes, sistemas automáticos para la mezcla de muestra y reactivos y accesorios para el correcto control de la temperatura, han permitido que los métodos cinéticos luminiscentes

sean alternativas válidas en análisis automático de rutina frente a los métodos de equilibrio. Algunas aplicaciones analíticas de la metodología cinética utilizando luminiscencia sensibilizada de lantánidos han sido comentadas en la introducción general de esta Memoria.

Cabe destacar que el carácter dinámico de la metodología cinética evita o minimiza la señal estática de la matriz de la muestra, la cual frecuentemente afecta a la señal analítica obtenida en el equilibrio. Además, puesto que no es necesario esperar a que se estabilice la señal analítica, se acorta la duración de la etapa de medida. Por tanto, la utilización de medidas de velocidad de reacción ofrece dos propiedades muy deseables en análisis de rutina como son selectividad y rapidez.

La técnica de mezcla de flujo detenido [23-25] permite de forma muy simple la automatización de las medidas cinéticas. En ella, los reactantes de un sistema químico se distribuyen entre dos jeringas, denominadas jeringas de impulsión, y son conducidos a gran velocidad hacia la cámara de mezcla que también suele ser la celda de observación del instrumento. El flujo se detiene bruscamente mediante una tercera jeringa, denominada jeringa de parada, permitiendo la obtención inmediata de la curva cinética señal-tiempo

cuando el sistema ha alcanzado el estado estacionario. Mediante un soporte informático adecuado se obtienen los valores de velocidad inicial de reacción o, en su caso, de amplitud de señal.

Algunas características de esta técnica se resumen a continuación: 1) mezcla rápida, completa y automática de los reactantes, 2) bajo consumo de los mismos, 3) aplicable a sistemas rápidos y lentos, 4) gran precisión, 5) minimización de interferencias, 6) obtención rápida de resultados, y 7) automatización de la etapa de medida. Estas características permiten obtener una gran velocidad de muestreo, lo que justifica su utilización en análisis de rutina. La etapa de medida generalmente requiere sólo segundos o décimas de segundo. En sus inicios, esta técnica se orientó principalmente hacia el estudio de la cinética y mecanismo de reacciones rápidas. No obstante, su utilidad en análisis de rutina ha sido suficientemente demostrada [24,26], siendo su campo de aplicación extraordinariamente amplio.

III.1.3. Optimización multivariante

Puede considerarse que la quimiometría es actualmente una herramienta imprescindible en Química Analítica ya que mediante algoritmos matemáticos se consigue extraer la información química

que encierran los datos experimentales. La optimización de variables constituye una parte básica de la quimiometría, especialmente cuando las variables experimentales implicadas en un sistema químico son continuas, es decir, están interrelacionadas. La optimización univariante, en la que se modifica una variable mientras se mantienen constantes las restantes, sólo puede utilizarse cuando las distintas variables son independientes. En caso contrario, es imprescindible recurrir a la optimización multivariante utilizando un método quimiométrico. Existen dos opciones para abordar esta optimización, secuencial y simultánea. La estrategia secuencial consiste en realizar inicialmente una serie de experimentos y, a partir de los resultados obtenidos, diseñar el siguiente experimento. En una estrategia simultánea se planifican todos los experimentos que se van a llevar a cabo y posteriormente se evalúan los resultados obtenidos. A este grupo pertenecen los diseños factoriales.

El término diseño experimental [27,28] se utiliza para describir el grupo de experimentos que se realizan para desarrollar un método, como puede ser la optimización de productos o procesos. En este caso, el diseño experimental se aplica para determinar los valores óptimos de las condiciones experimentales que afectan a la obtención de un determinado producto o al desarrollo de un proceso concreto.

Los factores se definen como las variables que se modifican de manera controlada para estudiar el efecto que tienen o pueden llegar a tener en las características del producto o proceso en estudio. Los diferentes valores que se asignan a los factores se denominan niveles, mientras que las características del producto o proceso que se quieren optimizar se denominan respuestas. El modelo que relaciona la respuesta con el efecto de los factores es la función respuesta o superficie de respuesta.

La definición de diseño experimental se refiere a varios factores, ya que normalmente se estudian todas las posibles variables que pueden afectar al sistema, por lo que se considera una aproximación multivariante. Con ello se pretende obtener de forma eficaz productos o procesos con las características más deseables, realizando el menor número de experimentos. El diseño experimental se utiliza para optimizar respuestas, por lo que es básico elegir adecuadamente los niveles extremos entre los que se van a estudiar los factores. De esta manera se determina el conjunto óptimo de los valores que han de tener los factores para conseguir las mejores características del producto o proceso investigado.

El número de factores involucrados en el diseño y el número de niveles asignados a cada factor son los descriptores de los diseños

factoriales. El diseño experimental más directo y fácil de entender comprende medidas de la respuesta para todas las combinaciones posibles de factores a todos los niveles que les han sido asignados. Por tanto, cada diseño experimental completo genera K^P combinaciones de factores, siendo P el número de factores que van a ser investigados y K el número de niveles de cada factor. El principal inconveniente de estos diseños es que el número de experimentos crece muy rápidamente cuando el número de factores aumenta. Para paliar esta limitación se recurre a los diseños factoriales fraccionados que simplifican el proceso, aunque se puede producir pérdida de información.

III.1.4. Sulfitos y Fosfatos

Los iones sulfitos se utilizan frecuentemente como conservantes alimentarios, en la producción de frutas deshidratadas, zumos de frutas, jarabes y purés, así como en el proceso de elaboración del vino [29]. También pueden estar presentes en el vino debido a algunos procesos metabólicos. Estos iones impiden el crecimiento de levaduras, mohos y bacterias, y también la decoloración de los grupos carbonilos producidos por reacciones de oxidación enzimática y no enzimática. Un aspecto negativo del uso de los sulfitos como conservantes en alimentos es que pueden causar

respuestas alérgicas en asmáticos y en pieles sensibles. También interaccionan con algunas vitaminas, como la tiamina, reduciendo la calidad nutricional de los alimentos que las contienen. La determinación de sulfitos, libres y/o totales, en vinos tiene gran interés para evaluar sus propiedades sensoriales.

Los métodos de Monier-Williams [30] y de la p-rosanilina [31] se consideran métodos oficiales para la determinación de sulfitos en vinos y en frutas. Se han desarrollado otros métodos basados en LC con detección UV [32,33], fluorescente [34] y conductimétrica [35]. También se ha descrito el uso de la electroforesis capilar con detección UV [36] y conductimétrica [37] con este fin.

El control de la concentración de fosfatos en agua es básico, debido a que son nutrientes esenciales para la vida acuática. Su concentración en aguas naturales debe ser menor de 0.1 mg l^{-1} ($1.05 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$) para considerarla pura [38]. Una concentración mayor puede causar eutrofización, es decir, un crecimiento excesivo de algas que es perjudicial para el medio ambiente ya que reduce la concentración de oxígeno disuelto en el agua. La reglamentación técnico-sanitaria española adopta como valor orientador de calidad hasta 170 microgramos por litro de fósforo en agua, y hasta 400

microgramos en P_2O_5 . El valor máximo tolerado es 2.15 miligramos por litro en fósforo [39].

Las principales fuentes antropogénicas de fosfatos en el agua son las actividades industriales y agrícolas, debido a su presencia en detergentes y fertilizantes. Algunos países han reducido la eutrofización implantando medidas para disminuir la descarga de fosfatos. Por otra parte, cabe indicar que los fosfatos son usados en el tratamiento del agua potable con diversos fines, tales como en el control del hierro y magnesio.

La mayoría de los métodos empleados para la determinación de fosfato en agua se basan en la formación de azul de molibdeno mediante la reducción del fosfomolibdato. Se han descrito sistemas basados en inyección en flujo para automatizar esta determinación [40-44]. También se han desarrollado algunas modificaciones a este método fotométrico clásico, que consisten en la formación de un par iónico entre el fosfomolibdato y un colorante catiónico, como la Rodamina B [45] o el verde de malaquita [46], o la adición de antimonio para formar el azul de fosfoantimonilmolibdeno [47]. Esta última modificación se ha usado para desarrollar un test rápido para la determinación de fosfatos mediante la formación de una banda coloreada en una columna de adsorción.

REFERENCIAS

1. P. Signo, A. Barassi, R. Novario, G.V. Melzi-d'Éril, *Clin. Chem. Lab. Med.*, 43 (2005) 883.
2. P. Suominen, K. Punonen, A. Rajamaki, R. Majuri, V. Aníñen, K. Irjala, *Clin. Chem.* 45 (1999) 1302.
3. R. Gottschalk, R. Wigand, C.F. Dietrich, G. Oremek, F. Liebisch, D. Hoelzer, J.P. Kaltwasser, *Clin. Chim. Acta* 293 (2000) 127.
4. P. Datta, D. Scurlock, A. Dasgupta, *Ther. Drug Monitor.* 27 (2005) 305.
5. A. Hamano, M. Umeda, Y. Ueno, S. Tanaka, J. Mimuru, Y. Sakata, *Clin. Chem.* 51 (2005) 183.
6. G. Del Rey-Pineda, A. Gómez-Muñoz, J.L. Arredondo-García, *Perinatol. Reprod. Hum.* 10 (1996) 247.
7. C.Z. Huang, Y.F. Li, *Anal. Chim. Acta*, 500 (2003) 105.
8. J.Y. Xie, Z.L. Jiang, *Acta Phys. Chim. Sin.* 17 (2001) 406.
9. J. Yguerabide, E.E. Yguerabide, *J. Cell. Biochem.* 37 (2001) 71.
10. J. Yguerabide, E.E. Yguerabide, *Anal. Biochem.* 262 (1998) 137.
11. S. Schultz, D.R. Schmidt, J.J. Mock, D.A. Schultz *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97 (2000) 996.

12. S.P. Liu, H.Q. Luo, N.B. Li, Z.F. Liu, W.X. Zheng, *Anal. Chem.* 73 (2001) 3907.
13. Q.E. Cao, Z.T. Ding, R.B. Fang, X. Zhao, *Analyst* 126 (2001) 144.
14. X.Y. Du, S. Sasaki, H. Nakamura, I. Karube, *Talanta* 55 (2001) 93.
15. R.T. Liu, J.H. Yang, X. Wu, T. Wu, *Analyst* 126 (2001) 1367.
16. S.Z. Zhang, F.L. Zhao, K.A. Li, S.Y. Tong, *Anal. Chim. Acta* 431 (2001) 333.
17. W. Lu, C.Z. Huang, Y.F. Li, *Anal. Chim. Acta* 475 (2003) 151.
18. C.Q. Zhu, D.H. Li, Q.Z. Zhu, H. Zheng, Q.Y. Chen, H.H. Yang, J.G. Xu, *Fresenius J. Anal. Chem.* 366 (2000) 863.
19. P. Bao, A.G. Frutos, C. Greef, J. Lahiri, U. Muller, T.C. Peterson, L. Warden, X. Xie, *Anal. Chem.* 74 (2002) 1792.
20. T. Peterson, G. Bee, J. Zhu, C. Greef, K. Rhodes, L. Korb, N. Montejano, E. Yguerabide, S. Fait, L. Warden, J. Yguerabide, *Clin. Chem.* 46 (2000) 1975.
21. C.Z. Huang, Y.F. Li, W. Lu, *Curr. Top. Anal. Chem.* 3 (2002) 253.
22. C.Z. Huang, W. Lu, Y.F. Li, *Rev. Anal. Chem.* 21 (2002) 267.
23. Q.H. Gibson, L. Milnes, *Biochem. J.* 91 (1964) 161.
24. A. Gómez-Hens; D. Pérez-Bendito; *Anal. Chim. Acta* 242 (1991) 147.

25. D. Pérez-Bendito, M. Silva, A. Gómez-Hens, Trends Anal. Chem. 8 (1989) 302.
26. D. Pérez-Bendito, M. Silva, Kinetic Methods in Analytical Chemistry; Ellis Horwood; Chichester (1988).
27. D.C. Montgomery, Diseño y Análisis de Experimentos; Grupo Editorial Iberoamérica, 1991.
28. E. Morgan, Chemometrics: Experimental Design, John Wiley & Sons Ltd, 1991.
29. H.D. Belitz, W. Grosch, Chapter 8. Food additives in Food Chemistry, Springer-Verlag, Berlin (1986), 344.
30. AOAC Official Method 990.28. (Optimized Monier-Williams Method) AOAC Official Methods of Analysis, 2000, Chapter 47, 29-30.
31. AOAC Official Method 963.20. AOAC Official Methods of Analysis, 2000, Chapter 47, 26-27.
32. L. Pizzoferrato, G. Di Lullo, E. Quattrucci, Food Chem. 63 (1998) 275.
33. Y. Miura, M. Hatakeyama, T. Hocino, P.R. Haddad, J. Chromatography A 956 (2002) 77.
34. L.M. Edmond, E.A. Magee, J.H. Cummings. LC-GC Europe, 16 (2003), 88.
35. S. Fäldt, B. Kalberg, W. Frenzel Fresenius J. Anal. Chem. 371 (2001) 425.

36. L. Saavedra, C.Barbas, *Electrophoresis*, 24 (2003) 2235.
37. M. Masár, M. Danková, E. Ölvecká, A. Stachurová, D. Kaniansky, B. Stanilawski *J. Chromatography A*, 1026 (2004), 1026, 31-39.
38. C.A. Sigmund; *Pristine waters: Examining the chemistry of streams, lakes and rivers*, Langara Press, Vancouver, BC (1996), 147.
39. www.ambientum.com/enciclopedia/aguas/2.01.18.51_1r.html
40. R.L. Benson, Y.B. Truong, I.D. McKelvie, B.T. Hart; *Wat. Res.* 30 (1996) 1959.
41. H.J. Heckemann; *Anal. Chim. Acta* 410 (2000) 177.
42. G. Hanrahan, M. Gledhill, P.J. Fletcher, P.J. Worsfold; *Anal. Chim. Acta* 440 (2001) 55.
43. C.H. Wu, J. Ruzicka, *Analyst* 126 (2001) 1947.
44. S. Karthikeyan, S. Hashigaya, T. Kajiya, S. Hirata; *Anal. Bioanal. Chem.* 378 (2004) 1842.
45. Z. Li; M. Oshima, A. Sabarudin, S. Motomizu; *Anal. Sci.* 21 (2005) 263.
46. E. D'Angelo, J. Crutchfield, M. Vandiviere, *J. Environ. Qual.*, 30 (2001) 2206.
47. Y. Kiso, K. Kuzawa, Y. Saito, T. Yamada, M Nagai, Y.J. Jung, K.S. Min; *Anal. Bioanal. Chem.* 374 (2002) 1212.

III.2. EQUIPOS Y MATERIALES

III.2.1 EQUIPOS

El equipo empleado para el desarrollo de los métodos propuestos en este capítulo fue un espectrómetro de luminiscencia SLM Aminco (Urbana, IL, USA) AB2 equipado con una lámpara continua de xenon de 150 W. A la configuración en T del instrumento se le ajustaron un monocromador 9050, sensible para medidas en la zona del visible y del infrarrojo cercano, y un tubo fotomultiplicador Hamamatsu R636-10, suministrados por ScienceTech (London, Ontario, Canadá), para obtener medidas a larga longitud de onda.

El instrumento también fue equipado con un módulo de flujo detenido. La celda de observación del módulo tiene un paso de radiación de 1 cm. Las rendijas de excitación y emisión se ajustaron para obtener un paso de luz de 4 y 16 nm, respectivamente. Las medidas de velocidad inicial se obtuvieron a temperatura ambiente.

Para la etapa de preconcentración de los fosfatos en agua se usó un sistema de vacío de 24 puertos Visi-Prep, Sulpeco (Bellefonte, PA, USA).

Se utilizó una balanza analítica OHAUS Explorer de 110 g, que tiene una precisión de hasta 0.0001 g y con un error de ± 0.001 g y un pHmetro Metrohm 744.

III.2.2. MATERIALES

Los reactivos usados fueron todos de grado analítico.

Se preparó una disolución 0.02 mol l^{-1} de iterbio(III) disolviendo la cantidad apropiada de nitrato de iterbio pentahidratado (Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Alemania) en agua destilada. Como disoluciones estándares de los analitos se prepararon diariamente una disolución madre de sulfito sódico (0.01 g l^{-1}) (Merck, Darmstadt, Alemania) en agua destilada y una disolución madre de hidrógeno fosfato disódico anhidro (0.01 g l^{-1}) (Merck, Darmstadt, Alemania) en agua, la cual se conservó a temperatura ambiente.

Para la preconcentración de los iones fosfato se usó una resina cambiadora de aniones fuertemente básica Dowex 1 (1x4-400) (Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Alemania). También se empleó una disolución de hidróxido sódico 1 mol l^{-1} (Merck) para ajustar el pH.

III.3. PROCEDIMIENTOS

III.3.1. DETERMINACIÓN DE SULFITOS Y FOSFATOS

Se utiliza una disolución acuosa que contiene iterbio(III) (0.02 mol l^{-1} , pH 6.7) para llenar una de las dos jeringas del módulo de flujo detenido. Para la determinación de sulfitos se llena la otra jeringa con disoluciones de estándares o muestras de vino, que contienen de 1 a $250 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ de sulfito a pH 9.0. En el caso de los fosfatos, esta jeringa se llena con disoluciones de estándares o muestras de agua que contienen de 0.09 a 7.9 mmol l^{-1} de fosfato a pH 9.0. En ambos casos, en cada inyección se mezclan 0.15 ml de cada disolución en la cámara de mezcla, y se registra la variación de la dispersión de la radiación con el tiempo a $\lambda_{\text{ex}} 490$ y $\lambda_{\text{em}} 980\text{nm}$ durante 2 segundos.

Los datos se procesan en un ordenador equipado con un programa de regresión lineal para la aplicación del método de velocidad inicial. Ésta se mide en sólo 0.5 segundos y cada estándar o muestra se ensaya por triplicado. La señal del blanco se resta para cada medida.

III.3.2. DETERMINACIÓN DE SULFITO TOTAL EN MUESTRAS DE VINO BLANCO

Se toman dos alícuotas de 1 ml de muestra de vino blanco. Una de ellas se trata con 0.4 ml de hidróxido sódico 0.5 mol l^{-1} , se agita durante 30 segundos, se ajusta el pH a 9.0 y se enrasa a 10 ml con agua destilada. Con esta disolución se llena una de las jeringas del módulo de flujo detenido. Para la segunda alícuota se utiliza un procedimiento similar, pero se incluye además un tratamiento con peróxido de hidrógeno (0.2 %) durante unos dos minutos, con el fin de oxidar los iones sulfitos a sulfatos. La señal correspondiente a los sulfitos se obtiene mediante la diferencia entre las señales correspondientes a las dos alícuotas.

III.3.3. DETERMINACIÓN DE FOSFATOS EN MUESTRAS DE AGUA

Se ajusta el pH de la muestra de agua (1 l) a 7.30, con NaOH 1 mol l^{-1} , y se pasa a través de una minicolumna empaquetada con 0.5 g de una resina cambiadora de aniones fuertemente básica (Dowex 1, 1x4-400). La columna se acondiciona previamente con 5 ml de NaCl (0.1 mol l^{-1}) y 5 ml de agua destilada. Los fosfatos son eluidos de la columna con 1.5 ml de HCl 0.1 mol l^{-1} . El pH de esta disolución

Nuevas estrategias metodológicas mediante iones lantánidos aplicables al análisis de rutina

se ajusta a 9.0 con hidróxido sódico, y se diluye a un volumen final de 2 ml. Esta disolución se trata como se ha descrito para la determinación de los fosfatos.

III.4. USEFULNESS OF YTTERBIUM(III) AS ANALYTICAL REAGENT FOR TOTAL SULFITE DETERMINATION IN WHITE WINE SAMPLES

Trabajo publicado en la revista "Journal of Agricultural and Food Chemistry" (2004, 52, 7777-7781).

Nuevas estrategias metodológicas mediante iones lantánidos aplicables al análisis de rutina

**USEFULNESS OF YTTERBIUM(III) AS ANALYTICAL
REAGENT FOR TOTAL SULFITE DETERMINATION IN WHITE
WINE SAMPLES**

R. C. Rodríguez-Díaz, M. P. Aguilar-Caballos and A. Gómez-Hens*
*Department of Analytical Chemistry, University of Córdoba, Marie Curie
building annex, Campus of Rabanales, E-14071 Córdoba, Spain*

ABSTRACT

Ytterbium(III) is used as reagent for the determination of sulfite by measuring the formation of the Yb(III)-sulfite complex through the variation of the light scattering intensity with time. The low solubility of this complex causes an efficient dispersion of the radiation at 490 nm, which is measured at 980 nm. Each kinetic data is automatically obtained in only 0.5 s by stopped-flow mixing technique. The application of the initial rate method using a long emission wavelength minimizes the potential interference of fluorescent background signals from the sample matrix. The dynamic range of the calibration graph is 1-250 µg/ml and the calculated detection limit is 0.35 µg/ml. The precision, expressed as relative standard deviation, is lower than 6 %. The method has been applied to the

determination of total sulfites in white wine samples, which only requires the sample dilution and the use of two aliquots to improve selectivity. However, the matrix effect found for red wines precludes the application of the method to the direct analysis of these samples. Analytical recoveries ranged from 96.0 to 106.7 %. The results obtained with the proposed method agreed with those provided by p-rosaniline method. Unlike this method, in which toxic reagents are required, the use of ytterbium(III) as analytical reagent shows the advantage of its low acute toxic rating.

Keywords: ytterbium; long-wavelength measurements; total sulfite; white wine samples

1. INTRODUCTION

Trivalent lanthanides have attracted interest as analytical reagents in recent years owing to the special luminescent properties of some chelates of these ions, which are the result of an efficient intramolecular energy transfer process from the excited triplet state of the ligand to the emitting level of the lanthanide ion. Eu(III) and Tb(III) ions, which emit green and red light, have been extensively used for analytical purposes (1,2), but other lanthanide ions such as Yb(III), Nd(III) and Er(III), which emit in the near IR region, have been scarcely described as analytical reagents. The spectral properties of some chelates of these ions with porphyrins (3), azo-compounds (4-7), calixarenes (8) and macrocyclic compounds (9-12) have been studied and an Yb(III) chelate has been described as label in a qualitative immunoassay method for human chorionic gonadotropin (13). The scarce analytical applicability of these ions can be ascribed in part to the fact that the luminescence of their chelates in solution is strongly influenced by some factors such as dissolved oxygen or –OH oscillators vibrations (5,8).

Sulfites are frequently used as preservatives in the production of dehydrated fruits, fruit juices, syrups, concentrates or puree and in the course of wine making (14). In the latter case, they can be also

present naturally due to some metabolic processes derived from the mineral absorption from soils. The presence of sulfites in the medium prevents the growth of yeast, moulds and bacteria and also the discoloration of carbonyl groups produced by enzymatic and non enzymatic oxidation reactions. The determination of free and/or total sulfites is common in wine laboratories as these parameters affect the sensory properties and evolution of wines. Total sulfite can be determined using an appropriate alkaline treatment (15). A negative aspect of the use of sulfites as food preservatives is that they can cause allergenic responses in asthmatics and skin sensitivity. Also, they interact with some vitamins such as thiamine, pyridoxal, nicotinamide and folic acid, reducing the nutritional quality of treated foods (16).

The traditional method for the determination of sulfites in foods and beverages is the Monier-Williams method (17), which involves an acid distillation step to release sulfite as sulfur dioxide that is transferred, using a carrier gas stream, to an oxidizing trapping solution containing hydrogen peroxide in an alkaline medium. The sulfite content is then determined by titration or gravimetrically as sulfate. The p-rosaniline method (18) has been also accepted by AOAC for the determination of sulfites in foods, although the toxicity of the reagents required (formaldehyde, tetrachloromercurate and p-

rosaniline) could be a limitation. This method has been applied to the analysis of wine samples using a gas diffusion unit to prevent color interference of red wine (19). Other methods for sulfite determination have been described using liquid chromatography with UV (16), fluorescence (20) and conductivity (15,21) detection, and capillary electrophoresis with both UV (22) and conductivity (23,24) detection. In some instances, a previous conversion of sulfites into sulfates using hydrogen peroxide is required to improve selectivity (15,21). Most of these methods (15,21-23) have been applied to the determination of free or total sulfite in wine.

The present method describes the use of ytterbium as reagent to obtain the initial rate of the Yb(III)-sulfite complex formation, which is used as the analytical parameter. The low solubility of this complex allows the measurement of changes in light scattering intensity with time, which are obtained using a spectrofluorimeter furnished with a near-IR emission monochromator and a sensitive detector to obtain dispersion signals at a long wavelength. This approach can minimize the potential interference of some background signals. The system is developed in aqueous solution, avoiding the presence of organic solvents such as dimethylsulfoxide or dimethylformamide, which have been used to obtain luminescence signals of several Yb(III) complexes previously reported (8). The high initial rate of the Yb(III)-

sulfite complex is automatically measured using stopped-flow mixing technique, which also allows the automatic mixing of the reactants. To the best of our knowledge, there is no previous report on the use of a lanthanide ion to determine sulfites.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Apparatus

An SLM Aminco (Urbana, IL, USA) AB2 luminescence spectrometer equipped with a 150 W xenon lamp was used. A 9050 visible and near-IR monochromator and an R636-10 Hamamatsu red sensitive photo multiplier tube, both supplied by ScienceTech (London, ON, Canada) were fitted to the T-format configuration of the instrument to obtain long-wavelength measurements. The instrument was also furnished with a stopped-flow module (25). The observation cell of the module has a path-length of 1 cm, and the excitation and emission slits were adjusted to provide 4 and 16-nm band-pass. Initial rate measurements were obtained at room temperature.

2.2. Reagents

All chemicals used were of analytical reagent grade. A 0.01 g/L stock solution of sodium sulfite (Merck, Darmstadt, Germany) was prepared daily in distilled water. A 0.02 mol/L ytterbium(III) solution was made by dissolving an appropriate amount of ytterbium(III) nitrate pentahydrate (Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Germany) in distilled water. A 1 mol/L sodium hydroxide (Merck, Darmstadt, Germany) solution was used to adjust the pH.

2.3. Procedures

2.3.1. Determination of sulfite

An aqueous solution containing Yb(III) (0.02 mol/L, pH 6.7) was used to fill one of the two 2-ml drive syringes of the stopped-flow module. The other syringe was filled with standard or wine sample solution containing from 1 to 250 $\mu\text{g/ml}$ sulfite at pH 9.0. In each run, 0.15 ml of each solution was mixed in the mixing chamber and the variation of the light scattering signal throughout the reaction was monitored at λ_{ex} 490 and λ_{em} 980 nm for 2 s. Data were processed by the computer, furnished with a linear regression program for application of the initial-rate method. The reaction rate was determined in ca. 0.5 s and each standard or sample was assayed in triplicate. The blank signal was subtracted from each measurement.

2.3.2. Determination of total sulfite in white wine samples

Two 1-ml aliquots of white wine samples were used. One aliquot was treated with 0.4 ml of 0.5 mol/L sodium hydroxide and mixed by stirring for 30 s. Afterwards, the pH of the solution was adjusted to 9.0 and diluted to 10 ml with distilled water. This solution was used to fill one of the drive syringes of the stopped-flow module. A similar procedure was used for the second aliquot, but including also its treatment with hydrogen peroxide (0.2%) for ca. 2 min to achieve the oxidation of sulfite to sulfate. The signal corresponding to sulfite was calculated by subtracting the signal given by the second aliquot from that obtained by analyzing the first aliquot.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Study of the system

Although the formation of insoluble complexes of lanthanide ions with sulfites has been previously described (26,27), the potential analytical application of these reactions has not been studied up to date. Several assays have been carried out to study the kinetic behavior of Nd(III), Eu(III), Tb(III) and Yb(III) with sulfites by measuring the variation of the light scattering intensity with time using stopped-flow mixing technique. The best kinetic curves were

obtained using Yb(III) at a pH close to the formation of its hydroxide. Electron diffraction analysis by x-ray (EDAX) and IR spectroscopy were used to study the composition of the white precipitate formed. EDAX analysis showed the presence of ytterbium, sulfur and oxygen in the precipitate. The IR spectrum showed an intense band at 3407 cm^{-1} , which can be ascribed to a -OH stretch and also to the presence of S-O bonds. Also, there were some bands at 631 and 1013 cm^{-1} , which could be attributed to compounds containing bisulfite or sulfite. Taking into account that lanthanide ions are oxidizing agents, Yb(III) could partially convert sulfite into sulfate ions and the presence of these ions could be explained by a band appearing at 1130 cm^{-1} . Other bands appearing at 1384 , 1459 , 1520 , 1562 and 1643 cm^{-1} can be ascribed to nitrate ions and N-O stretch. As Yb(III) ions were obtained from a nitrate salt, this anion could also be present in the ytterbium coordination sphere, taking into account the high coordination number of lanthanide ions and the high concentration of the ytterbium salt used ($2 \times 10^{-2}\text{ mol/L}$) to obtain the precipitate.

The selection of the optimum excitation (λ_{ex}) and emission (λ_{em}) wavelengths was carried out obtaining the light scattering spectrum of the Yb(III)-sulfite system by scanning simultaneously with the same λ_{ex} and λ_{em} . The highest light scattering signal was obtained at

490 nm. Also, this wavelength allowed obtaining the maximum initial rate of the system. A limitation of this approach is that the presence of a fluorescent species that absorbs or emits at a wavelength close to 490 nm could interfere this analytical signal. This fact was checked measuring the initial rate of the system in the absence and presence of a 10^{-6} mol/L fluorescein (λ_{ex} 487, λ_{em} 510 nm) solution, obtaining a decrease in the initial rate of four-times when fluorescein was present. The same assay was carried out using the second-order grating effect, maintaining the same λ_{ex} but changing the λ_{em} at 980 nm. In this instance, the initial rate of the system only decreased by 10% in the presence of fluorescein, which shows that the selectivity obtained measuring light scattering intensity can be improved using this long λ_{em} . The instrumentation available, with a xenon lamp, did not allow obtaining data using the λ_{ex} at 980 nm. Thus, λ_{ex} 490 and λ_{em} 980 nm were chosen to study the Yb(III)-sulfite system, using the second-order grating effect, which allows the potential interference of blank signals to be minimized.

The method presented here reports a new alternative approach for the use of lanthanide ions as analytical reagents by monitoring the variation of light scattering intensity with time and measuring the initial rate of the system.

The use of stopped-flow mixing technique simplifies the mixing of reagents and allows the automatic acquisition of kinetic data, obtaining each measurement in only 0.5 s. Figure 1 shows several kinetic curves obtained at different sulfite concentrations and using these wavelengths, a linear relation between the initial rate and sulfite concentration was observed.

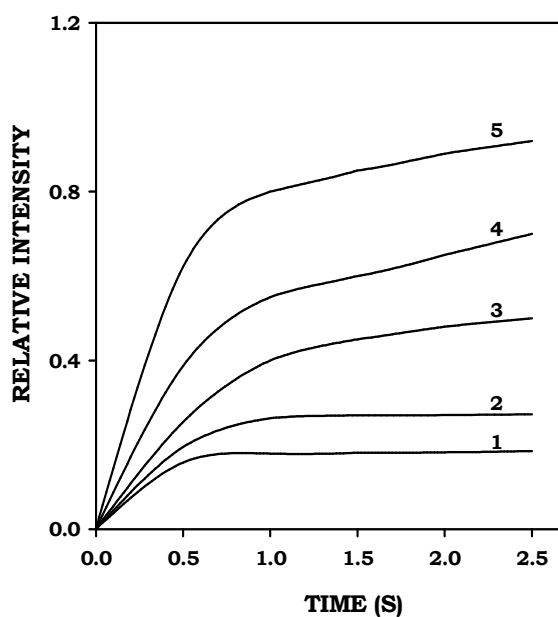


Figure 1. Kinetic curves obtained at λ_{ex} 490 and λ_{em} 980 nm at different sulfite concentrations: (1) 0; (2) 16; (3) 50; (4) 100 and (5) 200 $\mu\text{g/ml}$. $[\text{Yb(III)}] = 0.02$ mol/L

Nuevas estrategias metodológicas mediante iones lantánidos aplicables al análisis de rutina

Several organic solvents were assayed to study their potential effect on the initial rate of the system. Table 1 shows the results obtained, which includes also the effect of β -cyclodextrin, polyvinyl alcohol and gelatin, which were assayed to modify the properties of the medium such as viscosity and rigidity.

Table 1. Influence of different solvents and other species on the initial rate of the system

Solvent ^a	Initial rate ratio (%)
Water	100.0
Ethanol	80.2
Dimethylsulfoxide	70.4
Dimethylformamide	67.3
Acetonitrile	63.0
Ethyleneglycol	55.1
2-Propanol	37.7
Acetone	37.7
Methanol	35.4
β -cyclodextrin	7.8
Poliviny alcohol	28.4
Gelatin	0.0

^athe percentage of each solvent was 10% excepting for poliviny alcohol and β -cyclodextrin which was 0.67%

As can be seen, the best initial rate is obtained in aqueous medium. Also, the potential effect of the surfactants cetyltrimethylammonium bromide, sodium dodecylsulfate and Triton X-100, was studied at concentrations below and above their critical micellar concentration, but the initial rate of the system did not improve in any case.

3.2. Optimization of Variables

The variables affecting the system were optimized by the univariate method. All reported concentrations are initial concentrations in the syringes (twice the actual concentrations in the reaction mixture at time zero after mixing). Each kinetic result was the average of three measurements. Those values yielding the minimum possible standard deviation for the initial rate, under conditions where the reaction order with respect to the species concerned was zero or near zero, were taken as optimal.

The pH of the reaction medium is a critical variable that required its separate optimization in both ytterbium and sulfite solutions. Figures 2.A and 2.B show the results obtained, in which can be seen that the optimum pH range of the ytterbium solution is very narrow

and coincides with the pH at which the ytterbium hydroxide starts its formation (28). This behavior indicates that the presence of hydroxyl groups is required for the formation of the complex and justifies in part the broad band appeared at 3407 cm^{-1} in the IR spectrum. When the pH of the ytterbium solution was 6.7, the optimum pH range of the sulfite solution is 8.5-10.5 (Fig. 2.B), obtaining a pH range in the reaction medium of 6.5-6.6, as measured in the waste. This decrease in the pH of the mixture could be ascribed to the hydrolysis reaction of the ytterbium excess. Several buffer solutions [hexamethylene tetramine (hexamine), imidazole and ammonium acetate] were assayed to fit the optimum pH of the ytterbium solution, but a decrease in the initial rate was obtained in all instances. For this reason, the pH was finally adjusted using hydrochloric acid and/or sodium hydroxide solutions. Figure 3 shows the effect of the ytterbium concentration on the initial rate of the system, in which can be seen that it is independent of this variable in the range 1.8×10^{-2} - 2.5×10^{-2} mol/L.

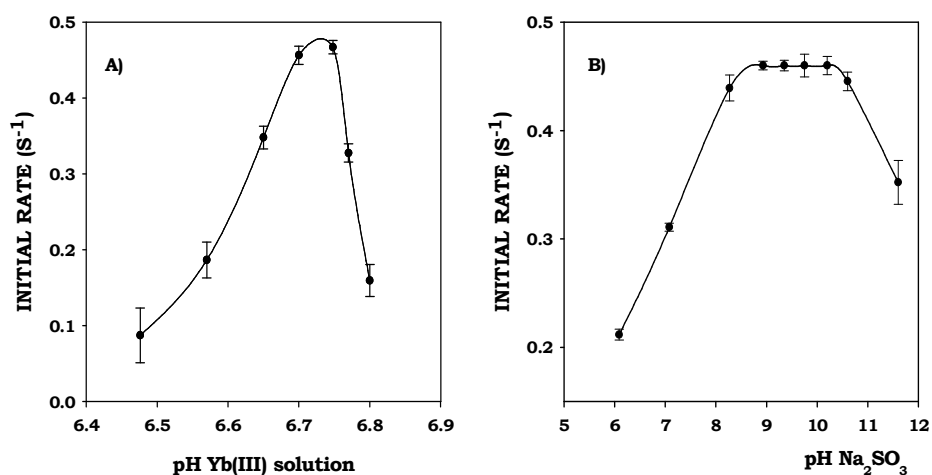


Figure 2. Influence of pH of the ytterbium (A) and sulfite (B) solutions on the initial rate of the system. [Yb(III)] = 0.02 mol/L; [sulfite] = 100 µg/ml

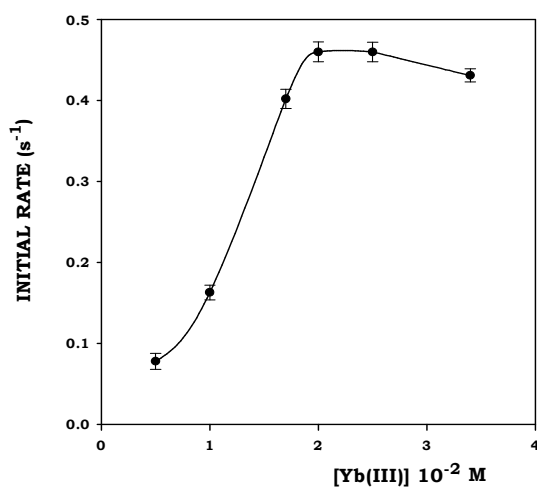


Figure 3. Influence of the ytterbium concentration on the initial rate of the system. [sulfite] = 100 µg/mL

3.3. Analytical Features

The kinetic curves obtained under optimum conditions and using λ_{ex} 490, λ_{em} 980 nm to monitor the variation of the light scattering intensity with time were processed using initial rate measurements, which were obtained in ca. 0.5 s. The dynamic range of the calibration graph was 1-250 $\mu\text{g/ml}$. The difference between the initial rate obtained in the presence and in the absence of sulfite can be linearly correlated with sulfite concentration, being the regression equation $v = (2.2 \pm 2.1) \times 10^{-4} + (4.6 \pm 0.2) \times 10^{-3} X$, where v is the initial rate, expressed in s^{-1} and X is the sulfite concentration expressed in $\mu\text{g/ml}$. The Pearson's correlation coefficient (r) is 0.996, which is indicative of a good linearity of the calibration curve. The detection limit calculated following IUPAC recommendations (29) was 0.35 $\mu\text{g/ml}$. Another calibration graph was also obtained using equilibrium measurements, which were measured 10 s after the mixing of the reactants, but the dynamic range (6.4-100 $\mu\text{g/ml}$) was narrower and the detection limit (1.9 $\mu\text{g/ml}$) was higher than those obtained using the kinetic method. Thus, this method was chosen for the determination of sulfites and applied to the analysis of wine samples. As indicated in the procedure for wine analysis, each sample is diluted ten-times, so that the detection limit in the original

samples is 3.5 µg/ml, which is similar to the detection limits reported for other sulfite methods (15, 23, 24).

The precision of the method was assessed at two different sulfite concentrations, 20 and 100 µg/ml, and expressed as the percentage of relative standard deviation, giving 5.8 and 1.2%, respectively. The selectivity was evaluated assaying some species that can be present in wine samples, which could be considered as potential interferents. A substance was considered not to interfere if the initial rate obtained in the presence of the interferent was within one standard deviation of the signal obtained in its absence.

Table 2 lists the maximum tolerated interferent/analyte ratio, in which can be seen that only phosphates interfere at the same concentration level than that of the analyte. This interference can be ascribed to the formation of the ytterbium phosphate, which would contribute to the scattering phenomenon in the same way as sulfite ions do. Taking into account that wine samples can contain phosphates and other potential interferents, a calibration graph was obtained preparing two series of standards and treating one of them with hydrogen peroxide to transform sulfite into sulfate, so that the initial rates obtained for these standards can be taken as the blank signals, as sulfate does not interfere up to a concentration 20-times

Nuevas estrategias metodológicas mediante iones lantánidos aplicables al análisis de rutina

higher than that of sulfite. The same equation of the calibration graph than that given above was obtained using the difference between the initial rate measured in the presence and absence of hydrogen peroxide for each standard as the analytical parameter.

Table 2: Influence of foreign substances over the determination of 10 µg/ml sulfite

Compound	Maximum tolerated interferent/analyte ratio ^a	Compound	Maximum tolerated interferent/analyte ratio ^a
Fructosa	500	F ⁻	100
Glucosa	500	Ascorbic acid	60
Cu ²⁺	100	SO ₄ ²⁻	20
Acetic acid	100	Tartaric acid	20
Ca ²⁺	100	Succinic acid	10
Fe ³⁺	100	2-mercapto-1-methyl-imidazole	10
K ⁺	100	Vanillic acid	10
Na ⁺	100	S ²⁻	10
NO ₂ ⁻	100	CO ₃ ²⁻	5
NO ₃ ⁻	100	PO ₄ ³⁻	---
Cl ⁻	100		

^aMaximum concentration tested was 5000 µg/ml

3.4. Applications

The proposed method was applied to the analysis of several wine samples. The addition of a diluted alkali solution releases the bound sulfite fraction, which allows the determination of total sulfite content analyzing the sample immediately after the treatment. Each sample was treated according to the procedure described above and the sulfite concentration was calculated by interpolating on the calibration graph. White wine samples were directly analyzed, giving satisfactory results, but the red wine samples assayed gave an excessively high initial rate that precluded their analysis. The application of the proposed method to these samples would require the previous separation of sulfite, in a similar way to other methods such as the Monier-Williams (17) and p-rosaniline (18) methods. Table 3 shows the results obtained by using the proposed method and those obtained by applying the p-rosaniline method, which was used as reference. The table also shows the pH and the total titratable acidity of the analyzed samples. The application of the paired t-test (30) showed that there were not any significant differences in the results given by both methods. Sulfite was present in all samples assayed and only one of them contained sulfite in a concentration higher than that allowed by European legislation (31), which is as much as 275 µg/ml when the sugar content is equal or higher than 5 g/L.

Nuevas estrategias metodológicas mediante iones lantánidos aplicables al análisis de rutina

Table 3. Analysis of white wine samples

Sample	pH	Content ($\mu\text{g/ml}$)		
		Total titratable acidity ^a	p-rosaniline method ^b	Proposed method ^b
1	3.01	3.88	36.7 \pm 0.1	33 \pm 2
2	3.06	5.02	44.03 \pm 0.03	45 \pm 4
3	3.04	5.54	327.1 \pm 0.2	331 \pm 6
4	3.02	5.18	176.46 \pm 0.05	185 \pm 10
5	2.95	5.54	23.63 \pm 0.02	29.36 \pm 0.04
6	3.12	4.82	34.26 \pm 0.02	33.47 \pm 0.03
7	3.08	6.77	113.5 \pm 0.1	117.07 \pm 0.2
8	3.18	4.77	104.64 \pm 0.07	103.96 \pm 0.07

^aUnits: g tartaric acid/L

^bMean \pm SD (n = 5)

An additional advantage of the use of ytterbium as reagent is its very little acute toxicity and no carcinogenicity if compared with the p-rosaniline method, in which the reagents used, p-rosaniline, formaldehyde and tetra chloromercurate, show an acute toxicity and/or potential carcinogenicity. Table 4 also lists the analytical recoveries obtained by the proposed method, which were calculated by adding three different amounts of sulfite to each sample and subtracting the results obtained from similarly unspiked samples. The recoveries ranged from 96.0 to 106.7%.

Table 4. Recoveries of sulfite added to white wine samples

Sample	Added ($\mu\text{g/ml}$)	Found ^a ($\mu\text{g/ml}$)	Recovery (%)
1	75	73 ± 2	97.3
	100	102 ± 5	102.0
	150	151 ± 6	100.7
2	75	77 ± 1	102.7
	100	98 ± 2	98.0
	150	160 ± 1	106.7
3	75	77 ± 7	102.7
	100	106 ± 4	106.0
	150	159 ± 10	106.0
4	75	74 ± 1	98.7
	100	99 ± 5	99.0
	150	145 ± 8	96.7
5	75	73.7 ± 0.9	98.3
	100	103 ± 3	103.0
	150	146 ± 9	97.3
6	75	76 ± 2	101.3
	100	100 ± 2	100.0
	150	154 ± 6	102.7
7	75	80 ± 3	106.7
	100	96 ± 6	96.0
	150	160 ± 10	106.7
8	75	75.8 ± 0.8	101.1
	100	99 ± 4	99.0
	150	144 ± 5	96.0

^aMean \pm SD (n = 5)

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors gratefully acknowledge financial support from the Spanish MCyT (Ministerio de Ciencia y Tecnología) (Grant N° BQU2003-03027).

LITERATURE CITED

1. Rieutord A., Prognon P., Brion F., Mahuzier G. Liquid-chromatographic determination using lanthanides as time-resolved luminescence probes for drugs and xenobiotics: advantages and limitations. *Analyst*, **1997**, 122, 59R-66R.
2. Gómez-Hens A., Aguilar-Caballos M.P., Terbium-sensitized luminescence: a selective and versatile analytical approach. *Trends Anal. Chem.*, **2002**, 21, 131-141.
3. Staninski K., Kaczmarek M., Lis S., Elbanowski M. Emission spectroscopic properties of water soluble porphyrins in hydrogen peroxide chemiluminescence system with d- and f-electron metals, *J. Solid State Chem.*, **2003**, 171, 208-211.
4. Shavaleev N.M., Pope S.J.A., Bell Z.R., Faulkner S., Ward M.D. Visible-light sensitisation of near-infrared luminescence from Yb(III), Nd(III) and Er(III) complexes of 3,6-bis(2-pyridyl)tetrazine, *Dalton Trans.*, **2003**, 5, 808-814.

5. Steemers F.J., Verboom W., Hofstraat J.W., Geurts F.A.J., Reinhout D.N. Near-infrared luminescence of Yb³⁺, Nd³⁺, and Er³⁺ azatriphenylene complexes, *Tetrahedron Letters*, **1998**, 39, 7583-7586.
6. Kawamura Y., Wada Y., Iwamuro M., Kitamura T., Yanagida S. Near-infrared Electroluminescence from Ytterbium(III) complex, *Chem. Letters*, **2000**, 29, 280-281.
7. Hong Z.R., Liang C.J., Li R.G., Zhao D., Fan D. and Li W.L., Infrared electroluminescence of ytterbium complexes in organic light emitting diodes, *Thin Solid Films*, **2001**, 391, 122-125.
8. Shevchuk S.V., Rusakova N.V., Turianskaya A.M., Korovin Y.V., Nazarenko N.A., Gren A.I., Shapiro Y.E. Novel ytterbium complexes of two Calix[4]resorcinarenes, *Anal. Commun.*, **1997**, 34, 201-203.
9. Faulkner S., Burton-Pye B.P., Khan T., Martin L.R., Wray S.D., Skabara P.J. Interaction between tetrathiafulvalene carboxylic acid and ytterbium DO3A: solution state self-assembly of a ternary complex which is luminescent in the near IR, , *Chem. Commun.*, **2002**, 16, 1668-1669.
10. Pope S.J.A., Kenwright A.M., Heath S.L., Faulkner S. Synthesis and luminescence properties of a kinetically stable dinuclear ytterbium complex with differentiated binding sites, *Chem. Commun.*, **2003**, 13, 1550-1551.

11. Korovin Y., Rusakova N. Near infrared luminescence of lanthanides in complexes with organic dyes, *J. Fluoresc.*, **2002**, 12, 159-161.
12. Beeby A., Dickins R.S., Faulkner S., Parker D., Williams J.A.G. Luminescence from ytterbium(III) and its complexes in solution, *Chem. Commun.*, **1997**, 15, 1401-1402.
13. Werts M.H.V., Woudenberg R.H., Emmerink P.G., van Gassel R., Hofstraat J.W., Verhoeven J.W. A near-infrared luminescent label based on Yb^{III} ions and its application in fluoroimmunoassay, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2000**, 39, 4542-4544.
14. Belitz H.D., Grosch W. Chapter 8. Food additives in *Food Chemistry*, Springer-Verlag, Berlin, 1986, p. 344.
15. Edmond L.M., Magee E.A., Cummings J.H. An IEC method for sulphite and sulphate determination in wine without predistillation, *LC-GC Europe*, **2003**, 16, 88, 90-95.
16. Pizzoferrato L., Di Lullo G., Quattrucci E. Determination of free, bound and total sulfites in foods by indirect photometry-HPLC, *Food Chem.*, **1998**, 63, 275-279.
17. AOAC Official Method 990.28. (Optimized Monier-Williams Method) *AOAC Official Methods of Analysis*, **2000**, Chapter 47, pp. 29-30.

18. AOAC Official Method 963.20. *AOAC Official Methods of Analysis*, **2000**, Chapter 47, pp. 26-27.
19. Segundo M.A., Rangel A.O.S.S., Cladera A., Cerdá V. Multisyringe flow system: determination of sulfur dioxide in wines, *Analyst*, **2000**, 125, 1501-1505.
20. Miura Y., Hatakeyama M., Hocino T., Haddad P.R. Rapid ion chromatography of L-ascorbic acid, nitrite, sulfite, oxalate, iodide and thiosulfate by isocratic elution utilizing a postcolumn reaction with cerium(IV) and fluorescence detection, *J. Chromatography A*, **2002**, 956, 77-84.
21. Fäldt S., Kalberg B., Frenzel W. Hyphenation of gas-diffusion separation and ion chromatography. Part 1: Determination of free sulfite in wines, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **2001**, 371, 425-430.
22. Saavedra L., Barbas C. Validated capillary electrophoresis method for small-anions measurement in wines, *Electrophoresis*, **2003**, 24, 2235-2243.
23. Masár M., Danková M., Ölvecká E., Stachurová A., Kaniansky D., Stanilawski B. Determination of free sulfite in wine by zone electrophoresis with isotachopheresis sample pretreatment on a column-coupling chip, *J. Chromatography A*, **2004**, 1026, 31-39.
24. Kvasnička F., Míková K. Isotachopheretic determination of sulphite in mustard, *J. Food Comp. Anal.*, **2002**, 15, 585-591.

25. Loriguillo A., Silva M., Pérez-Bendito D. Versatile automatic stopped-flow system for routine analysis. *Anal. Chim. Acta*, **1987**, 199, 29-40.
26. Verma V.P. Review of thermoanalytical, IR, Raman and x-ray studies of solid metal sulfites, *Thermochim. Acta*, **1985**, 89, 363-382.
27. Leskela M., De Matos J.E.X., Niinisto L. Studies on lanthanoid sulfites. Part VII. Preparative and thermal study on rare earth sulfite sulfate hydrates. *Inorg. Chim. Acta*, **1987**, 139, 121-123.
28. Woyski M.M., Harris R.E. The rare-earths and rare-earth compounds, in *Treatise on Analytical Chemistry, Part II Analytical Chemistry of Elements* Volume 8, I.M. Kolthoff, P.J. Elving (Eds.), Wiley Interscience New York-London, **1963**, pp 36.
29. Long G.L., Winefordner J.D. Limit of detection. A closer look at the IUPAC definition, *Anal. Chem.*, **1983**, 55, 712A-724A.
30. Miller N.J., Miller J.C. in *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*. Fourth Edition. Pearson Education Limited, **2000**, p. 50.
31. Commission Regulation (EC) No 1622/2000, *Official Journal of the European Communities*, **(2000)** L 194, p. 7

III.5. DETERMINATION OF SOLUBLE PHOSPHATES IN WATER SAMPLES USING YTTERBIUM(III) AND DYNAMIC MEASUREMENTS OF LIGHT SCATTERING INTENSITY AT LONG WAVELENGTH

Trabajo publicado on-line en la revista "Talanta" desde el 18 de enero del 2006

Nuevas estrategias metodológicas mediante iones lantánidos aplicables al análisis de rutina

**DETERMINATION OF SOLUBLE PHOSPHATES IN WATER
SAMPLES USING YTTERBIUM(III) AND DYNAMIC
MEASUREMENTS OF LIGHT SCATTERING INTENSITY AT LONG
WAVELENGTH**

Rafael Carlos Rodríguez-Díaz, M^a Paz Aguilar-Caballos, Francisco
Rincón^a, Agustina Gómez-Hens*

Department of Analytical Chemistry, Marie Curie Building Annex,
Campus of Rabanales, University of Córdoba, E-14071 Córdoba, Spain.

^aDepartment of Food Science and Technology, Charles Darwin Building
Annex, Campus of Rabanales, University of Córdoba, E-14071 Córdoba,
Spain

ABSTRACT

A selective and fast method has been developed for the determination of phosphates by measuring the formation of ytterbium(III)-phosphate through the variation of the light scattering intensity with time. The low solubility of this compound causes an efficient dispersion of the radiation at 490 nm, which is measured at 980 nm using the second order grating effect. This approach minimizes potential background signals from the sample matrix. The initial rate of the system is automatically obtained in only 0.5 s by

stopped-flow mixing technique. The variable optimization study has been carried out using univariate and multivariate methods. The dynamic range of the calibration graph is 0.09 – 7.9 mmol L⁻¹, (Pearson's correlation coefficient = 0.9999) and the detection limit is 0.03 mmol L⁻¹. The precision of the method, expressed as relative standard deviation, is 2.3%. The study of the potential interference of different inorganic anions showed that arsenate is the main interferent, although it is tolerated in a molar ratio of 5.5. The method has been satisfactorily applied to the determination of soluble phosphates in tap, ground and river water using a previous preconcentration step with a Dowex 1(1x4-400) anionic resin. A 500-fold concentration has been achieved, which has allowed to decrease the detection limit up to 60 nmol L⁻¹. The recovery range is 97.5 – 102.5 %. The results obtained are consistent with those obtained with the standard molybdenum blue method.

Keywords: Phosphates, ytterbium(III), light scattering, stopped-flow, water analysis

1. INTRODUCTION

The concentration of phosphates in water is an important quality factor of water as they are essential nutrients for aquatic life. Clean natural water should have less than 0.1 mg L^{-1} ($1.05 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) of phosphates [1]. A higher concentration can lead to eutrophication, a condition of excessive algal growth, which can be harmful to the environment because it reduces the amount of free oxygen in the water. The main sources of phosphates present in waters are municipal wastewaters and agriculture, since phosphates can be present in detergents and fertilizers. A number of countries have been successful in reducing eutrophication through implementation of measures to reduce phosphate loads. On the other hand, phosphates are used in the potable water treatment to perform several functions such as iron and manganese control, scale inhibition and removal, corrosion control and chlorine stabilization.

Most methods for phosphate determination in water are based on the formation of phosphomolybdate and its reduction to molybdenum blue, which has been widely used in several automated flow injection systems [2-6]. Some modifications of this classical photometric approach involve the formation of an ion pair between phosphomolybdate and a cationic dye, such as Rhodamine B [7] or

Malachite Green [8], or the addition of antimony to form phosphoantimonylmolybdenum blue, which has been used to develop a spot test for phosphate based on the formation of a colored band in an adsorption column [9]. Analytical features and applications of flow methods for phosphorus determination have been recently reviewed [10-12].

The method described here reports a new and relatively simple alternative approach that involves the measurement of the initial rate of ytterbium(III) phosphate formation, by monitoring the variation of light scattering intensity with time. The solubilities of lanthanide phosphates are so low that their solubility and activity products essentially have the same value, being the ytterbium(III) phosphate one of the most insoluble of these phosphates, with a pK of 26.17 [13].

Ytterbium(III) has been scarcely described as analytical reagent, unlike other lanthanide ions such as europium(III) and terbium(III), which have been widely used in numerous luminescent methods [14,15]. Although several luminescent ytterbium(III) chelates have been reported, their luminescence in solution is easily quenched by dissolved oxygen or –OH oscillator vibrations [16,17]. Recently, a kinetic method for sulfite determination in wine samples has been

described, which is based on the formation of the ytterbium(III)-sulfite precipitate and the measurement of the variation of light scattering intensity with time [18]. Phosphate ions were the main interference of this method, as they contributed to the scattering phenomenon in the same way as sulfite ions did. However, this interference was avoided by preparing a calibration graph with two series of standards and treating one of them with hydrogen peroxide to transform sulfite into sulfate, so that the initial rates obtained for these standards were taken as the blank signals as sulfate did not interfere up to a concentration twenty times higher than that of sulfite. The behavior of phosphate ions in this sulfite method has been taken as the starting point to develop a selective kinetic method for the determination of these species, as the interference of sulfite can be avoided by treating previously the sample with hydrogen peroxide. Univariate and multivariate methods have been used to carry out the optimization of the chemical system. The application of a composite central design (CCD) to perform the multivariate optimization of the ytterbium(III) concentration and the sample pH, which are two critical variables of the system, showed that both variables are independent. The results provided by this method have been compared to those by univariate method, which assumes the independence of variables as an initial premise. The detection limit of the method has been

improved using a preconcentration step with an anionic exchange resin.

2. EXPERIMENTAL

2.1. Materials

All chemicals used were of analytical reagent grade and ultrapure MilliQ water (Millipore, USA) was used throughout. A 0.02 mol L⁻¹ ytterbium(III) solution was made by dissolving an appropriate amount of ytterbium(III) nitrate pentahydrate (Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Germany) in water. A 0.01 mol L⁻¹ solution of di-sodium hydrogen phosphate anhydrous (Merck, Darmstadt, Germany) was prepared in water and stored at room temperature. A sodium hydroxide (Merck) solution (1 mol L⁻¹) was used to adjust the pH. A Dowex 1 (1x4-400) strongly basic anion exchanger (Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Germany) was used for the preconcentration step.

2.2. Apparatus

An SLM Aminco (Urbana, IL) AB2 luminescence spectrometer equipped with a 150 W xenon lamp was used. A 9050 visible and NIR monochromator and an R636-10 Hamamatsu red-sensitive

photomultiplier tube, both supplied by ScienceTech (London, ON, Canada), were fitted to the T-format configuration of the instrument to obtain long-wavelength measurements. The instrument was also furnished with a stopped-flow module [19]. The observation cell of the module has a path length of 1 cm, and the excitation and emission slits were adjusted to provide 4 and 16 band-pass, respectively. Initial rate measurements were obtained at room temperature. A 24-port Visi-Prep vacuum device from Supelco (Bellefonte, PA, USA) was used for the ion exchange step.

2.3. Procedure

One of the two 2-ml drive syringes of the stopped-flow module was filled with an aqueous solution containing ytterbium(III) (0.02 mol L⁻¹, pH 6.7). The other syringe was filled with standard or water solution containing from 0.09 to 7.9 mmol L⁻¹ phosphate at pH 9.0. A volume of 0.15 ml of each solution was mixed in the mixing chamber in each run, and the variation of the light scattering signal throughout the reaction was monitored at λ_{ex} 490 and λ_{em} 980 nm for 2 s. Kinetic data were obtained by applying the initial rate method to the values acquired from the detector, which were processed by the computer, furnished with a linear regression program for application of this kinetic method. The initial rate was measured in only 0.5 s, and each

standard or sample was assayed in triplicate. The blank signal was subtracted from each measurement.

2.4. Analysis of water samples

The pH of the water sample (1 L) was adjusted to 7.30 with 1 mol L⁻¹ sodium hydroxide, and it was passed through a microcolumn packed with 0.5 g of a strongly basic anion-exchange resin (Dowex 1, 1x4-400), previously conditioned with 5 ml of NaCl (0.1 mol L⁻¹) and 5 ml of distilled water. After sample application, phosphate was eluted with 1.5 ml of 0.1 mol L⁻¹ HCl. The pH of this solution was adjusted to 9.0 with sodium hydroxide and the solution was diluted to a final volume of 2 ml. This solution was treated as described above for phosphate determination.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Study of the system

The features of ytterbium(III) phosphate have been widely described using X-ray diffraction and IR and Raman spectroscopies [20]. Also, the optical and spectroscopic properties of ytterbium(III)-doped phosphate glasses have been studied with the aim of applying

these glasses as laser materials [21,22]. However, the potential use of ytterbium(III) as analytical reagent for phosphate determination has not been described up to date, although the measurement of the formation of the ytterbium(III) phosphate can be a simple and useful approach for this purpose owing to its low solubility [13].

The use of a spectrofluorimeter allows to follow the formation of this compound by measuring the variation of the light scattering intensity with time and using the initial rate of this reaction as the analytical parameter. As the reaction is very fast, the mixture of the reactants has been automatically performed using stopped-flow mixing technique, which allows the measurement of high initial rate values. Each kinetic measurement is carried out in only 0.5 s. The optimum excitation (λ_{ex}) and emission (λ_{em}) wavelengths of the instrument were selected by obtaining a synchronous spectrum with $\lambda_{\text{ex}} = \lambda_{\text{em}}$. The highest light scattering intensity and initial rate were obtained at 490 nm. The measurement of the analytical signal at this wavelength could be interfered by the presence of fluorescent species that absorb or emit at a wavelength close to 490 nm. However, this effect can be minimized using the second-order grating effect, in which the emission wavelength is changed at 980 nm [18]. The spectrofluorimeter was furnished with a near infrared emission

monochromator and a sensitive detector to obtain dispersion signals at long wavelength.

The study of the effect of several organic solvents on the chemical system showed that all of them caused a decrease in the initial rate. The initial rate obtained in the presence of 0.67% ethanol, acetonitrile, acetone or methanol was the 88.8, 85.1, 79.5 and 51.1%, respectively, of the initial rate obtained in water. Other species such as α -cyclodextrin and polyvinyl alcohol also have a negative effect on the initial rate (62.6 and 61.3%, respectively, of the value obtained in water), while the presence of gelatin prevented the formation of the precipitate. Also, the surfactants cetyltrimethylammonium bromide, sodium dodecyl sulfate and Triton X-100 were assayed at concentrations below and above their critical micellar concentration, but the initial rate of the system did not improve in any case the value obtained in the aqueous medium alone.

3.2. Optimization of Variables

The variables affecting the system were optimized using univariate and multivariate methods, with the aim of comparing the values obtained in both instances. All reported concentrations are

initial concentrations in the syringes (twice the actual concentrations in the reaction mixture at time zero after mixing) and each kinetic result is the average of three measurements. Those values yielding the minimum possible standard deviation for the initial rate, under conditions where the reaction order with respect to the species concerned was zero or near zero, were taken as optimal.

Several assays carried out on the system showed that the two main critical chemical variables are the pH in the mixing chamber and the ytterbium(III) concentration. The optimization of the pH using the univariate method was carried out by studying separately the effect of the pH of both ytterbium(III) and phosphate solutions on the initial rate of the system. Figure 1.A shows that the optimum pH range of the ytterbium(III) solution is very narrow, obtaining the best initial rate value at pH 6.7, while the optimum pH values for the phosphate solution (Figure 1.B) range from 8.9 to 10.0. Under these conditions, the pH in the mixing chamber was 6.4-6.6, which was measured in the waste. This decrease in the pH of the reaction medium could be ascribed to the hydrolysis reaction of the ytterbium(III) excess [23]. The pH of both ytterbium(III) and phosphate solutions was adjusted using hydrochloric acid and/or sodium hydroxide solutions, because the initial rate of the system decreased in the presence of several buffer solutions assayed

[hexamethylenetetramine (hexamine), imidazole and ammonium acetate]. The initial rate of the system was independent of the ytterbium(III) concentration when the value of this variable was in the range 18 – 27 mmol L⁻¹ (Figure 2).

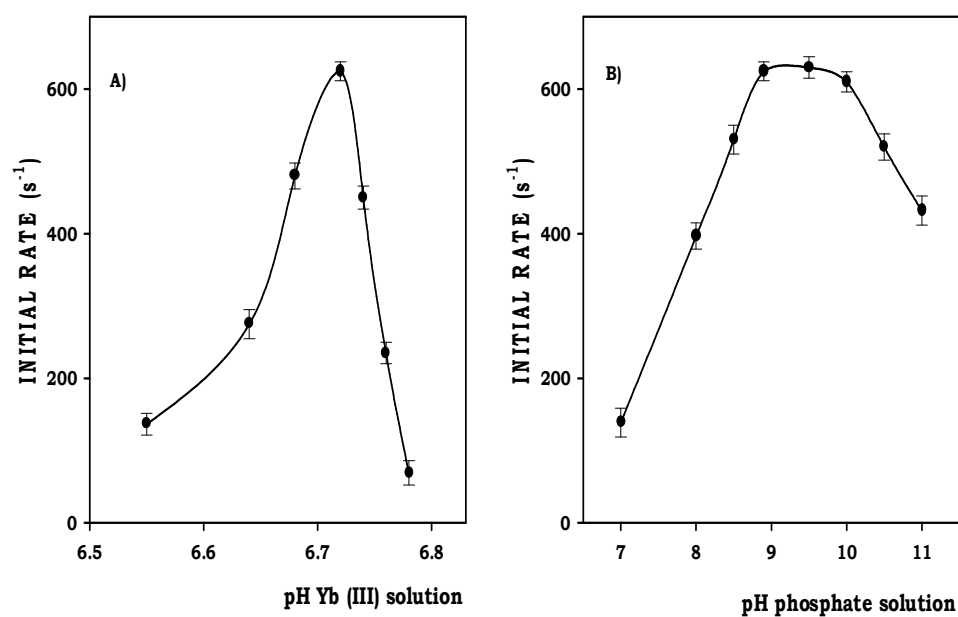


Figure 1. Variation of the initial rate of the system with the pH of the ytterbium(III) (A) and phosphate (B) solutions. [Yb(III)] = 20 mmol L⁻¹; [phosphate] = 5.3 mmol L⁻¹

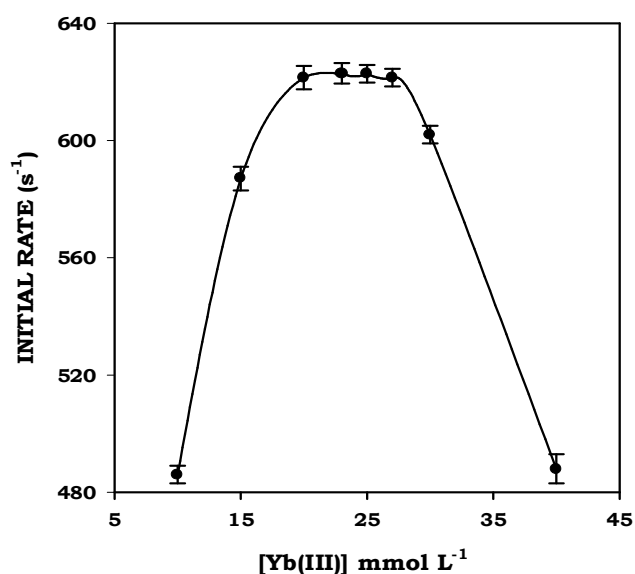


Figure 2. Variation of the initial rate of the system with the ytterbium(III) concentration. [phosphate] = 5.3 mmol L⁻¹

A central composite design (CCD) was used to apply the response surface methodology for the multivariate optimization of the system. This experimental design was chosen by assuming that only two input variables or critical factors (CF), namely the ytterbium(III) concentration and the pH of the phosphate solution, are considered. The CCD used was made rotatable by using an axial spacing (α) value of 1.41, as it corresponds to a 2-CF design [24]. As it is known, the rotatability of the system means that the variance of the estimated response is the same for all the points at the same radial

distance from the origin. These designs protect the system from biased correlation coefficients in a more effective way than orthogonal designs do. Table 1 shows both CF in actual (Y_R and pH) and coded (X_1 and X_2) forms, respectively. The coded form of variables is defined as dimensionless with zero as mean and with the same standard deviation [25]. Coded factors were assayed in five levels, also expressed in coded form, as it can be seen in Table 1.

Table 1. Levels of factors for optimization of assay conditions according to a central composite experimental design

Factors	Symbol		Levels				
	Coded	Actual	-1.41	-1	0	1	1.41
$[Yb]^{+3}, \text{mmol L}^{-1}$	X_1	Y_R	18.7	22.0	30.0	38.0	41.3
pH	X_2	pH	8.89	9.10	9.40	9.70	9.82

Three responses were measured, the pH of the blank reaction (R_1) and the pH of the sample reaction (R_2), which were measured in the waste, and the initial rate of the system (R_3), for both X_1 and X_2 . The CCD was carried out by using 10 experiences (Table 2). Numbers in run column of this table are those for experiments arranged in the logical order for combinations of coded levels for

each factor, while trial is the performance sequence of experiences. As it can be seen, they are randomly performed in order to avoid or minimize potential experimental errors from non controlled sources of variability.

Table 2. Central composite experimental design and results obtained for R_1 , R_2 and R_3

Run	Trial	X_1	X_2	R_1^a	R_2^a	R_3^a
8	1	0	1.41	6.75	6.30	398.36
3	2	1	-1	6.52	6.49	354.81
10	3	0	0	6.70	6.41	575.49
1	4	-1	-1	6.68	6.43	582.83
4	5	1	1	6.58	6.46	338.02
7	6	0	-1.41	6.59	6.44	618.36
9	7	0	0	6.71	6.42	572.19
6	8	1.41	0	6.62	6.52	253.50
2	9	-1	1	6.76	6.36	486.35
5	10	-1.41	0	6.77	6.30	500.41

^a R_1 : pH of the blank reaction; R_2 : pH of the sample reaction;
 R_3 : initial rate of the system

The response surface experiment was done by fitting the responses to both coded factors by a quadratic model using the expression:

$$\xi = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{12}X_1X_2 + \varepsilon,$$

Where ξ is each response, X_1 and X_2 are CF, X_1X_2 is the term for two-factor interactions and ε is the model error. The regression coefficients are given by b_0 (intercept), b_1 and b_2 (linear), b_{11} and b_{22} (quadratic), and b_{12} (cross product). Quadratic regression terms ($b_{11}X_1^2$ and $b_{22}X_2^2$) are indicative of the response surface curvature while the cross product regression term ($b_{12}X_1X_2$) gives the interaction degree between both CF. Table 3 shows the significant effects of both CF to each response, in which can be seen that two of the responses (R_1 and R_2) are correlated by linear effects, while the initial rate (R_3) is a quadratic function of the ytterbium(III) concentration. This variable has the most significant effect on the initial rate, which agrees with the results obtained using the univariate method. The effects have been considered significant if $p < 0.05$ (within 95% confidence interval). The empty cells in Table 3 correspond to effects with p values higher than 0.05. As can be seen, the term X_1X_2 was found to be negligible, what means that both factors are independent, and in this instance, the results obtained by using both univariate and response surface methods will lead to similar optimum data. The values for the coefficient of multiple correlation (R^2) indicate a good fitness of the experimental data what confirms that the initial choice of both CF involved was correctly done.

Table 3. Significant effects ($p \leq 0.05$) in terms of coded factors on R_1 , R_2 and R_3 obtained from the central composite experimental design

Factor	Responses ^a		
	R_1	R_2	R_3
X_1 -linear	-4.52	3.68	-7.24
X_1 -quadratic	---	---	-5.97
X_2 -linear	2.99	-2.33	-4.23
X_2 -quadratic	---	---	---
$X_1 X_2$	---	---	---
R^2	0.89	0.83	0.96

^a R_1 : pH of the blank reaction; R_2 : pH of the sample reaction; R_3 : initial rate of the system; R^2 : correlation coefficient

The location of the stationary point is shown in a two-dimensional plot (Figure 3). Solid lines give the response curves for initial rate and dotted lines for the pH of the sample reaction waste. The stationary point is given by (-0.55, -0.96), which corresponds to 25.5 mmol L⁻¹ ytterbium(III) and 9.11 for the pH of the phosphate solution. An increase in the ytterbium(III) concentration from the optimum value causes a notable decrease in the initial rate of the system. The pH of the sample reaction waste can act as a control response, since the stationary point is located between the curves corresponding to 6.40 and 6.45. Thus, a rapid pH measurement would afford the detection of any error that could deviate the system from its optimum working conditions. The results obtained from the two optimization methods

show that they reach similar results for the two variables studied and that they are independent variables.

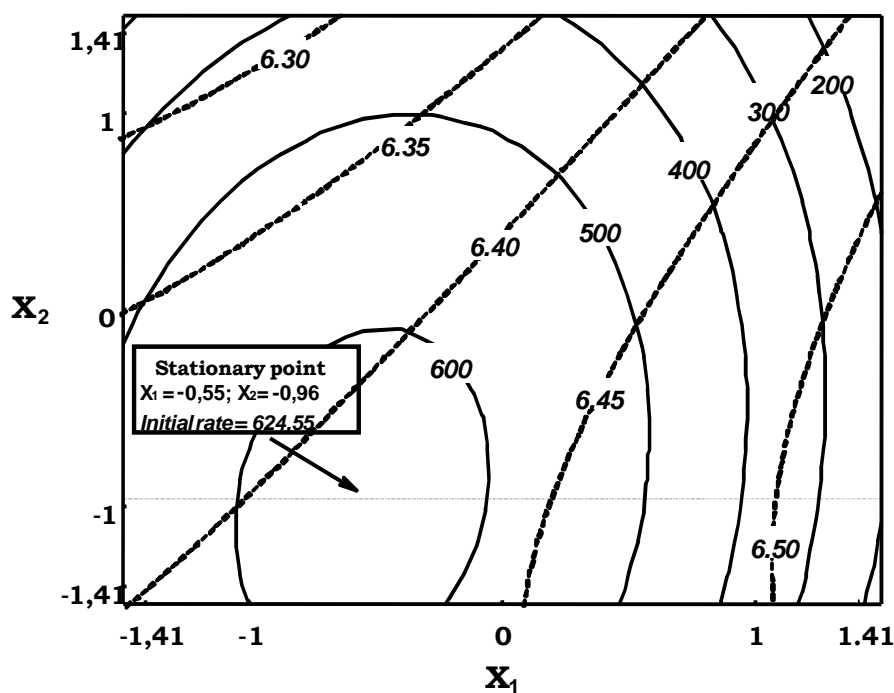


Figure 3. Location of the stationary point by the multivariate method. X_1 = Levels of ytterbium(III), X_2 = Levels of pH of the phosphate solution. Solid lines correspond to initial rate values (R_3) and dotted lines correspond to pH values of the reaction medium measured in the waste (R_2)

3.3. Features of the method

The kinetic curves obtained under optimum conditions and using λ_{ex} 490 and λ_{em} 980 nm for different phosphate concentrations were processed by monitoring the variation of light scattering intensity with time and measuring the initial rate of the system, which was obtained in 0.5 s. The analytical parameter used to obtain the calibration graph was the difference between the initial rate obtained in the presence and in the absence of phosphate. The dynamic range of the calibration graph was 0.09 - 7.9 mmol L⁻¹. The regression equation obtained was $v = - (8 \pm 10) + (120.3 \pm 0.7) C$, in which v is the initial rate, expressed in s⁻¹, and C is the phosphate concentration expressed in mmol L⁻¹. The Pearson's correlation coefficient (r) was 0.9999, which suggests a good linearity of the regression. The detection limit calculated according to IUPAC recommendations [26] was 0.03 mmol L⁻¹.

The precision of the method, expressed as the percentage of the relative standard deviation was evaluated using standards at two different phosphate concentrations, 0.50 and 1.00 mmol L⁻¹, giving 2.3 and 0.7 % respectively. The selectivity was studied by assaying some anions that can be present in water samples, which could be considered as potential interferents. Table 4 shows the maximum

tolerated interferent/analyte molar ratio. A substance was considered not to interfere if the initial rate obtained in the presence of the interferent was within one standard deviation of the signal obtained in its absence. Arsenate is the main interferent, but it is tolerated in a 5.5-fold molar excess. Although sulfite ions would interfere at the same concentration level as that of the analyte, this interference is easily avoided by treating the sample with hydrogen peroxide (0.2%) for 2 min to achieve the oxidation of sulfite to sulfate, which is tolerated up to a molar concentration 20 times higher than that of phosphate.

Table 4. Influence of anionic species over the determination of 0.5 mmol L⁻¹ phosphate

Compound	Maximum tolerated interferent/analyte molar ratio
Cl ⁻	300
NO ₃ ⁻	200
NO ₂ ⁻	200
F ⁻	50
S ²⁻	30
SO ₄ ²⁻	20
SO ₃ ²⁻	20 ^a
AsO ₄ ³⁻	5.5

^aafter treatment with hydrogen peroxide

3.4. Applications

The application of the proposed method to the determination of phosphate in water samples has been carried out using a preconcentration step. Several methods have been described for this purpose, which involve different approaches, such as the use of a molybdate-form anion exchange resin [27], a Zr-SP cartridge [28], and a silica-gel collector containing iron(III) [7], among others. In our case, we have obtained good results using a Dowex type I strongly basic anion-exchange resin, achieving a preconcentration factor of 500 for a sample volume of 1 L and thus, a LOD of about 60 nmol L⁻¹. This process has been carried out using a 24-port vacuum device, which allows the preparation of several samples at the same time. Also, the use of a cap at the upper side of the microcolumn with a Teflon tubing inserted in the cap provides an unattended loading of the sample to the column, with increased automation degree of the sample preparation.

Nuevas estrategias metodológicas mediante iones lantánidos aplicables al análisis de rutina

Table 5. Analysis of water samples

Sample	Photometric method ^a	Proposed method ^a			
	Content (μmol L ⁻¹) ^a	Content (μmol L ⁻¹) ^a	Recovery study		
			Added (μmol L ⁻¹)	Found ^a (μmol L ⁻¹)	Recovery (%)
Tap water	0.22 ± 0.02	0.25 ± 0.06	0.4	0.39 ± 0.01	97.5
			0.6	0.60 ± 0.02	100.2
			0.8	0.79 ± 0.01	98.8
Ground water	0.42 ± 0.02	0.43 ± 0.03	0.4	0.41 ± 0.01	102.5
			0.6	0.61 ± 0.05	101.7
			0.8	0.79 ± 0.03	98.8
River water	0.41 ± 0.02	0.40 ± 0.02	0.4	0.39 ± 0.02	97.5
			0.6	0.61 ± 0.07	101.7
			0.8	0.79 ± 0.06	98.8

^aMean ± confidence interval (95%, n=5)

The method has been applied to the analysis of three different water samples: tap-, ground- and river-water. Each sample was treated according to the procedure described above, and the analyte concentration was calculated by interpolating on the calibration curve. The results obtained are summarized on Table 5, which also shows the values obtained using the standard molybdenum blue method. The application of the paired t test [29] showed that there

were not any significant differences in the results given by both methods. Table 5 also shows the analytical recoveries obtained by the proposed method, which were calculated by adding three different amounts of phosphates to each sample and subtracting the results obtained from similarly prepared unspiked samples. As can be seen, the recoveries ranged from 97.5% to 102.5%.

4. CONCLUSIONS

The proposed method describes a fast and relatively simple approach for phosphate determination using ytterbium(III) as reagent and measuring the initial rate of the system by monitoring the variation of the light scattering intensity with time at a long wavelength. The use of a stopped-flow mixing technique simplifies the mixing of reagents and allows the automatic acquisition of kinetic data, obtaining each measurement in only 0.5 s. Although the detection limit of the method is relatively high, it is improved using a preconcentration step, which is usual in other methods for phosphate determination [7,27,28].

ACKNOWLEDGEMENTS.

Authors gratefully acknowledge financial support from the Spanish MCyT (Ministerio de Ciencia y Tecnología) Grant no. BQU2003-03027.

REFERENCES

- [1] C.A. Sigmund, *Pristine waters: Examining the chemistry of streams, lakes and rivers*, Langara Press, Vancouver, BC, (1996), p 147.
- [2] R.L. Benson, Y.B. Truong, I.D. McKelvie, B.T. Hart, *Wat. Res.*, 30 (1996) 1959.
- [3] H.J. Heckemann, *Anal. Chim. Acta*, 410 (2000) 177.
- [4] G. Hanrahan, M. Gledhill, P.J. Fletcher, P.J. Worsfold, *Anal. Chim. Acta*, 440 (2001) 55.
- [5] C.H. Wu, J. Ruzicka, *Analyst*, 126 (2001) 1947.
- [6] S. Karthikeyan, S. Hashigaya, T. Kajiya, S. Hirata, *Anal. Bioanal. Chem.*, 378 (2004) 1842.
- [7] Z. Li, M. Oshima, A. Sabarudin, S. Motomizu, *Anal. Sci.*, 21 (2005) 263.
- [8] E. D'Angelo, J. Crutchfield, M. Vandiviere, *J. Environ. Qual.*, 30 (2001) 2206.
- [9] Y. Kiso, K. Kuzawa, Y. Saito, T. Yamada, M. Nagai, Y.J. Jung, K.S. Min, *Anal. Bioanal. Chem.*, 374 (2002) 1212.
- [10] J.M. Estela, V. Cerdá, *Talanta*, 66 (2005) 307.
- [11] S. Motomizu, Z.H. Li, *Talanta*, 66 (2005) 332.
- [12] P.A. Morais, I.V. Tóth, A.O.S.S. Rangel, *Talanta*, 66 (2005) 341.

- [13] F.H. Firsching, S.N. Brune, *J. Chem. Eng. Data*, 36 (1991) 93.
- [14] A. Rieutord, P. Prognon, G. Mahuzier, *Analyst*, 122 (1997) 59R.
- [15] A. Gómez-Hens, M.P. Aguilar-Caballos, *Trends Anal. Chem.*, 21 (2002) 131.
- [16] F.J. Steemers, W. Verboom, J.W. Hofstraat, F.A.J. Geurts, D.N. Reinhout, *Tetrahedron Lett.*, 39 (1998) 7583.
- [17] S.V. Shevchuk, N.V. Rusakova, A.M. Turianskaya, Y.V. Korovin, N.A. Nazarenko, A.I. Gren, Y.E. Shapiro, *Anal Commun.*, 34 (1997) 201.
- [18] R.C. Rodríguez-Díaz, M.P. Aguilar-Caballos, A. Gómez-Hens, *J. Agric. Food Chem.*, 52 (2004) 7777.
- [19] A. Loriguillo, M. Silva, M.D. Pérez-Bendito, *Anal. Chim. Acta*, 199 (1987) 29.
- [20] H. Assaaoudi, A. Ennaciri, A. Rulmont, *Vib. Spectrosc.*, 25 (2001) 81.
- [21] C. Jiang, H. Liu, Q. Zeng, X. Tang, F. Gan, *J. Phys. Chem. Solids*, 61 (2000) 1217.
- [22] L. Zhang, H. Hu, C. Qi, F. Lin, *Opt. Mater.*, 17 (2001) 371.
- [23] M.M. Woyski, R.E. Harris, The rare-earths and rare-earth compounds, in *Treatise on Analytical Chemistry*, in I.M. Kolthoff, P.J. Elving (Eds.), Part II Analytical Chemistry of

- Elements, Wiley-Interscience, New York, vol 8, (1963), p 36.
- [24] D.C. Montgomery, Design and Analysis of Experiments, 6th Edn., Wiley, New York, (2005), Chapter 11
- [25] R.H. Myers, D.C. Montgomery, Introduction to response surface methodology, in G.E.P. Box & D.W. Montgomery (Eds.) Response surface methodology. Process and product optimization using designed experiments. New York, NY. Wiley, (1995), pp. 1-16
- [26] G.L. Long, J.D. Winefordner, Anal. Chem., 55 (1983) 712A.
- [27] T. Taniai, M. Sukegawa, A. Sakuragawa, A. Uzawa, Talanta, 61 (2003) 905.
- [28] M. Okumura, L. Tong, K. Fujinaga, Y. Seike, Fresenius J. Anal. Chem., 370 (2001) 104.
- [29] N.J. Miller, J.C. Miller, Statistics and chemometrics for analytical chemistry, 4th ed., Pearson Education, New York, (2000), p 50.

CAPÍTULO IV

Nuevas estrategias metodológicas mediante iones lantánidos aplicables al análisis de rutina

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Nuevas estrategias metodológicas mediante iones lantánidos aplicables al análisis de rutina

Este capítulo se dedica básicamente a la discusión de los resultados presentados en los capítulos anteriores, incluyendo también los aspectos más destacables de las investigaciones realizadas.

Uso de lantánidos en la tecnología de reactivos secos

El sistema en estudio consistió en la formación de quelatos de terbio(III) y europio(III) con los antibióticos ciprofloxacina y tetraciclina, cuya luminiscencia se midió de forma independiente a sus respectivas longitudes de onda de máxima excitación y emisión. Éstas fueron 284 y 545 nm para Tb-ciprofloxacina y 395 y 615 nm para Eu-tetraciclina, respectivamente, las cuales coinciden con las observadas para medidas de luminiscencia en disolución. Sin embargo, los valores de la duración de la luminiscencia (τ) aumentaron notablemente al utilizar el formato de reactivos secos. Este comportamiento es lógico, ya que se consigue eliminar o minimizar la influencia negativa que ejercen las moléculas de agua en la luminiscencia cuando se encuentran dentro de la esfera de coordinación del ión lantánido. Se demuestra así el efecto positivo del soporte sólido en la estabilización del estado excitado.

La elección del soporte se realizó de acuerdo con los resultados obtenidos con anterioridad para la determinación de benzocaína y procaína en preparados farmacéuticos [1] utilizando terbio como reactivo. Se escogió papel cromatográfico para obtener las tiras, las cuales se sometieron a un proceso de acondicionamiento mediante su inmersión en una disolución de sacarosa y su posterior secado. A continuación, se añadieron los lantánidos a la tira, secándola de nuevo. Estas tiras de reactivo son estables en estas condiciones durante seis meses como mínimo.

La adición de sacarosa posibilita la formación de microcristales que permiten minimizar las irregularidades del papel, se elimina la humedad y se protege a los quelatos de procesos de desactivación no radiantes, debidos a las colisiones entre moléculas. Este efecto protector ha propiciado que el uso de agentes sinérgicos, como óxido de tri n-octilfosfina (TOPO), tenoil trifluoroacetona (TTA) o ácido etilendiaminotetracético (AEDT) no sea necesario. No obstante, la luminiscencia del sistema Eu-tetraciclina aumentó notablemente en presencia de TTA, lo que es predecible ya que, como se comentó en la introducción de esta Memoria, los quelatos de europio son más sensibles a los factores ambientales que los de terbio. Sin embargo, el TTA afecta negativamente a la luminiscencia del quelato Tb-ciprofloxacina. Debido al distinto comportamiento de

los dos sistemas, se desechó la utilización de este ligando. Se ensayaron tensoactivos no iónicos, aniónicos y catiónicos, como Tritón X-100, dodecilsulfato sódico (SDS) y bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), encontrándose que la luminiscencia del sistema Tb-ciprofloxacina aumentó notablemente en presencia de SDS y en menor medida en presencia de CTAB. Para el quelato Eu-tetraciclina, el mayor aumento de la señal se observó en presencia del tensoactivo catiónico, por lo que éste fue escogido para el desarrollo de ambos métodos. El CTAB se adicionó con los estándares o muestras, ajustando el pH al valor adecuado.

La Tabla 1 muestra los intervalos estudiados para las variables químicas implicadas en los sistemas y los valores óptimos hallados mediante el método univariante.

Tabla 1. Optimización de las variables químicas de los sistemas Tb-ciprofloxacina y Eu-tetraciclina

Variable	Intervalo de estudio	Intervalo óptimo
[Tb(III)]	20-100 $\mu\text{mol l}^{-1}$	60 $\mu\text{mol l}^{-1}$
[Eu(III)]	20-80 $\mu\text{mol l}^{-1}$	60 $\mu\text{mol l}^{-1}$
[CTAB]	0.5-10 mmol l^{-1}	3 mmol l^{-1}
pH	4-9	5.3-6.3 Tb-ciprofloxacina 7.3-8.5 Eu-tetraciclina
[Tris]	0.01-0.1 mol l^{-1}	0.02-0.06 mol l^{-1}

Como puede observarse en la tabla, los intervalos óptimos de pH son distintos para cada sistema luminiscente, por lo que se optó por utilizar un pH de 7.3 como solución de compromiso. La luminiscencia del complejo Tb-ciprofloxacina a este pH es aproximadamente un 80% de la obtenida a su pH óptimo, mientras que la luminiscencia del complejo Eu-tetraciclina disminuiría un 50% si se utilizara el pH óptimo del otro complejo.

Una vez optimizado el sistema, se obtuvieron los datos de calibración y los límites de detección, que se calcularon según las recomendaciones de la IUPAC [2] (al igual que para todos los métodos desarrollados), mediante el uso de estándares preparados en agua destilada. El LOD obtenido para ciprofloxacina en disolución fue menor que el obtenido en el soporte sólido, debido a que la contribución del blanco fue menor en disolución. Sin embargo, la tetraciclina presentó mejor LOD en superficie sólida. La resolución de mezclas de ciprofloxacina y tetraciclina fue posible en relaciones comprendidas entre 5:1 y 1:10, con errores inferiores al 6%. Los estudios de selectividad realizados demostraron que otros antibióticos pertenecientes a los grupos de los macrólidos y de los aminoglucósidos, así como el salicilato, no interfirieron esta determinación. No obstante, otras tetraciclinas y quinolonas

interfieren las correspondientes determinaciones al mismo nivel de concentración de los analitos.

Para la aplicación del método al análisis de fluidos biológicos, las rectas de calibrado se realizaron en presencia de un 0.04% de orina y un 5% de suero, obteniéndose unos límites de cuantificación de 125 y 1.3 $\mu\text{g ml}^{-1}$ para ciprofloxacina, y 75 y 0.8 $\mu\text{g ml}^{-1}$ para tetraciclina, en muestras de suero y orina respectivamente. Estas concentraciones son suficientemente bajas, lo que permite la determinación de estas especies a sus niveles terapéuticos. Estos niveles son de 300-500 y 2.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ para ciprofloxacina, y de 300 y 1-5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ para tetraciclina en muestras de suero y orina, respectivamente [3]. El método se validó mediante estudios de recuperación, obteniéndose valores en el intervalo 88.7-109.3 %, siendo los valores medios 97.8 y 99.6 % para ciprofloxacina y tetraciclina, respectivamente.

Los resultados obtenidos demuestran la utilidad de la luminiscencia sensibilizada a doble longitud de onda mediante la tecnología de reactivos secos para el desarrollo de métodos rápidos, fácilmente aplicables al análisis de rutina. La aplicabilidad de este método podría extenderse al desarrollo de métodos de selección para determinar otros componentes de estas familias de antibióticos.

Uso del ión terbio(III) como reactivo derivatizante en disolución

Los resultados incluidos en este apartado se centran en el uso del ión terbio(III) como reactivo analítico en disolución. Su utilidad para la determinación directa de fluoroquinolonas se ha podido comprobar mediante medidas en el equilibrio, utilizando los modos de fluorescencia y de tiempo resuelto. Tras el estudio del comportamiento luminiscente de los quelatos terbio-quinolona, se han desarrollado diversos métodos basados en cromatografía líquida con derivatización post-columna para la determinación de estos antibióticos. Con objeto de extender la aplicabilidad de este ión como reactivo derivatizante a otros analitos, se ha estudiado la separación de compuestos fenólicos y su determinación en muestras de vino blanco.

Antibióticos quinolona

La realización de un estudio sistemático de la luminiscencia de los quelatos que forman los antibióticos quinolona con terbio(III) mostró un comportamiento similar para la mayoría de los compuestos ensayados. La intensidad de luminiscencia de estos quelatos depende del sustituyente del nitrógeno del anillo piridónico

y de la naturaleza y posición de otros sustituyentes en dicho anillo. Se seleccionó el quelato terbio-ciprofloxacina para desarrollar un método muy sensible aplicable a la determinación de este antibiótico en leche.

Se ha descrito que la utilización de tensoactivos puede mejorar la luminiscencia de los quelatos terbio(III)-quinolona [4-6] debido a la formación de medios organizados. Por ello, se ensayaron Tritón X-100, CTAB y SDS como modelos de tensoactivos no iónicos, catiónicos y aniónicos, respectivamente, a concentraciones por encima y por debajo de su concentración micelar crítica, obteniéndose un aumento en la luminiscencia en presencia de SDS para el quelato terbio-ciprofloxacina.

Aunque la utilización de ligandos sinérgicos se ha descrito anteriormente [7,8] para la determinación de estos antibióticos, se ensayaron TOPO, TTA y AEDT, encontrándose en general para todas las quinolonas, que ninguno de ellos originó un aumento en la intensidad de la señal luminiscente obtenida.

La optimización de las variables que afectan a los sistemas de las fluoroquinolonas en estudio se realizó mediante el método univariante. Se eligieron los valores de las variables para los que se

obtenía la máxima señal luminiscente o área de pico con la mínima desviación estándar posible.

Para la optimización del método directo para fluoroquinolonas en disolución, se escogió ciprofloxacina como analito modelo. Las medidas se realizaron fundamentalmente en el modo de tiempo resuelto, cuyas ventajas ya han sido expuestas en esta Memoria y, que en este caso concreto, permitió la eliminación de la dispersión de la radiación originada a la longitud de onda de excitación seleccionada (278 nm). Se estudió la influencia del pH, hallándose que la intensidad de luminiscencia fue independiente de esta variable en el intervalo óptimo 5.3-6.3. Se ensayaron distintas disoluciones reguladoras, como trietanolamina y acetato amónico para ajustar el pH a su valor óptimo. La intensidad de luminiscencia del sistema disminuyó notablemente en presencia de trietanolamina, mientras que no se afectó por la concentración de la disolución reguladora de acetato amónico en el intervalo 0.02-0.08 mol l⁻¹.

Una vez optimizado el sistema, se establecieron sus características analíticas, obteniendo un intervalo lineal de 0.5-1000 ng ml⁻¹. El límite de detección fue 0.14 ng ml⁻¹, muy inferior al obtenido mediante medidas de fluorescencia (1 ng ml⁻¹). Esta diferencia en los valores obtenidos puede atribuirse a la larga

duración de la luminiscencia de este quelato (0.37 ms), lo que permite integrar la señal durante un intervalo de tiempo.

En la Tabla 2 se muestran los límites de cuantificación (LOQs) obtenidos para las diferentes fluoroquinolonas ensayadas en las condiciones óptimas para ciprofloxacina.

Tabla 2. LOQs obtenidos para las fluoroquinolonas estudiadas

Fluoroquinolona	LOQ (ng ml ⁻¹)
Danofloxacina	0.29
Norfloxacina	0.36
Pefloxacina	0.41
Ciprofloxacina	0.5
Enrofloxacina	0.55
Difloxacina	0.73
Flumequina	2.11
Marbofloxacina	16.2
Levofloxacina	117

Como puede observarse, danofloxacina, norfloxacina, enrofloxacina, pefloxacina y difloxacina presentan LOQs similares a los obtenidos para ciprofloxacina. En el caso de flumequina, marbofloxacina y levofloxacina se obtuvieron valores sensiblemente

mayores, lo que en parte puede atribuirse a que se hallaron a una longitud de onda distinta a la de su máxima excitación.

La precisión del método, expresada como el porcentaje de la desviación estándar relativa, se evaluó a dos concentraciones diferentes de ciprofloxacina, obteniendo un intervalo de valores comprendidos entre 3.9 y 5 %. Se estudió la selectividad del método frente a otros agentes antibacterianos que fueron tolerados en relaciones analito/interferente 1:10 como mínimo.

El método propuesto se aplicó al análisis de diferentes muestras de leche, tales como entera, entera del día, semidesnatada y desnatada, para lo que se requirió una sencilla etapa de desproteización con acetonitrilo. Los resultados obtenidos para las rectas de calibrado y los LOQs en presencia del 1 % de la muestra de leche fueron idénticos a los obtenidos en ausencia ésta. Por tanto, se pudo utilizar la recta de calibrado con estándares acuosos para la determinación de este antibiótico en las muestras ensayadas. El método se validó mediante estudios de recuperación, cuyos valores estuvieron comprendidos entre 91.9 y 110.5%.

La flumequina fue otro antibiótico fluoroquinolona ensayado para el que se compararon las prestaciones analíticas de la reacción

directa de formación del quelato con terbio(III) y de este ión como reactivo derivatizante en cromatografía líquida (LC). Para ello, se desarrollaron los métodos correspondientes utilizando medidas de fluorescencia y tiempo resuelto, con 340 nm y 250 nm como longitudes de onda de excitación y 545 nm para la emisión.

Los estudios realizados para la optimización del método directo (presencia de agentes sinérgicos y surfactantes) condujeron a resultados similares a los obtenidos para ciprofloxacina. Para ciertas variables químicas, como el pH, se pudo observar que para la determinación de flumequina se requirió un pH más básico que el utilizado para ciprofloxacina. En cuanto a los métodos de LC desarrollados, se estudió la influencia de las variables relacionadas con la separación cromatográfica, la reacción de derivatización y la detección luminiscente, como aparece en la tabla del trabajo que constituye el apartado II.5 de esta Memoria. Cabe destacar la importancia que tiene sobre el sistema el ácido utilizado para preparar la fase móvil. Por ello se ensayaron los ácidos ortofosfórico, oxálico y acético, con el fin de minimizar el efecto inhibitor de las moléculas de agua en la luminiscencia sensibilizada de lantánidos [9], encontrándose que el terbio(III) precipitaba en presencia de los dos primeros. Se eligió el ácido acético para la preparación de la fase móvil ya que, además de no precipitar al ión terbio(III), se

produce un ligero aumento de la señal luminiscente en presencia de los iones acetato [9].

Una vez optimizadas las condiciones experimentales del sistema, se establecieron las características analíticas de los cuatro métodos propuestos para la determinación de flumequina. Los límites de detección (LODs) obtenidos se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Límites de detección obtenidos para la determinación de flumequina

Método	Modo	LOD (ng ml ⁻¹)
Convencional	Fluorescencia	0.05
	Tiempo resuelto	0.7
Cromatografía líquida	Fluorescencia	1.1
	Tiempo resuelto	15.0

Estos LODs se obtuvieron utilizando estándares en disolución acuosa. Como puede observarse, los valores obtenidos mediante fluorescencia fueron menores que para tiempo resuelto. Asimismo, los LODs proporcionados por los métodos directos fueron más bajos que los obtenidos con los métodos cromatográficos. Sin embargo,

los métodos directos fueron poco adecuados para conseguir la determinación selectiva de flumequina en presencia de otras quinolonas, debido a la similitud en el comportamiento luminiscente de sus quelatos lantánidos. Por tanto, fue necesaria la inclusión de una etapa de separación cromatográfica para su determinación.

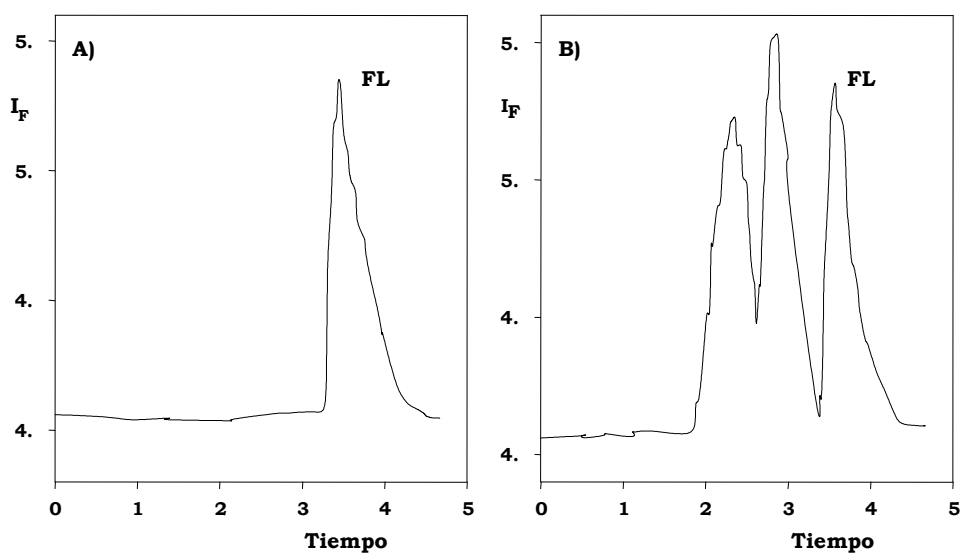


Figura 1. Cromatogramas obtenidos para la flumequina (300 ng ml^{-1}) mediante derivatización post-columna con terbio(III) y el modo fluorescencia en ausencia (A) y en presencia (B) de una mezcla que contiene 300 ng ml^{-1} de marbofloxacina, ciprofloxacina, danofloxacina, enrofloxacina, sarafloxacina, difloxacina y ácido oxolínico. Las condiciones experimentales utilizadas son las óptimas

La Figura 1 permite observar que el pico correspondiente a la flumequina está completamente separado de los picos en que aparecen agrupadas las otras quinolonas ensayadas, todas ellas utilizadas con fines veterinarios. Esta buena resolución con respecto a los otros antibióticos ensayados, se debe a que la fase móvil utilizada (ácido acético:acetonitrilo 30:70) permite que las otras quinolonas, más polares que la flumequina, se eluyan a tiempos de retención más cortos.

Los resultados obtenidos mediante la derivatización de flumequina con terbio(III) dirigieron las investigaciones a la separación de ocho antibióticos quinolona para su determinación simultánea. Estos antibióticos fueron marbofloxacin, ciprofloxacina, danofloxacina, enrofloxacina, sarafloxacina, difloxacina, ácido oxolínico y flumequina, utilizados en la práctica veterinaria. Para compatibilizar todos los sistemas luminiscentes se seleccionaron 340 y 281 nm para la excitación en el modo fluorescencia y tiempo resuelto, respectivamente.

La fase móvil utilizada contenía ácido acético al igual que para flumequina. El pH aparente de la fase móvil es una variable crítica para conseguir una buena resolución cromatográfica. Debe ser suficientemente ácido para que los analitos se encuentren en su

forma protonada. En las Figuras 2 y 3 se observa que se obtiene una mejor resolución de los picos a pH 3.0 y a una concentración 0.2% de HAc.

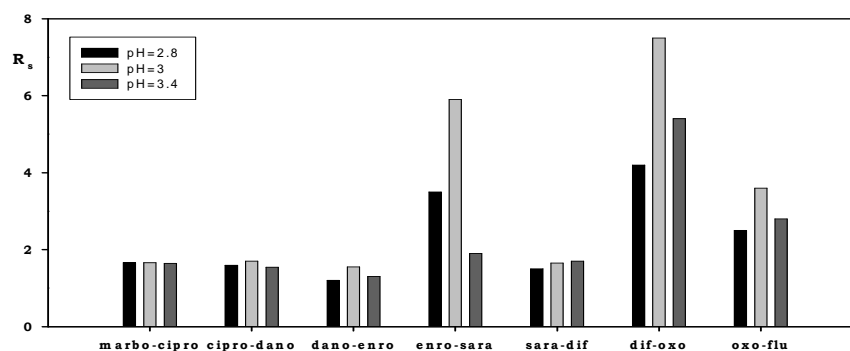


Figura 2. Influencia del pH aparente de la fase móvil en la resolución cromatográfica (R_s)

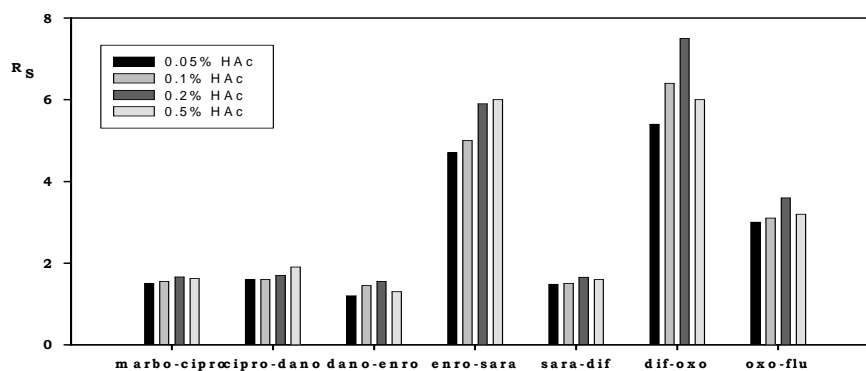


Figura 3. Influencia de la concentración del ácido acético de la fase móvil en la resolución cromatográfica (R_s)

Nuevas estrategias metodológicas mediante iones lantánidos aplicables al análisis de rutina

La fase móvil estaba constituida por una mezcla binaria de ácido acético y acetonitrilo. El gradiente utilizado (Figura 4) fue aquel que proporcionó la mejor resolución para la ciprofloxacina, danofloxacina y enrofloxacina y el menor tiempo de retención para el ácido oxolínico y la flumequina. La separación de las ocho quinolonas se realizó en 19 minutos aproximadamente.

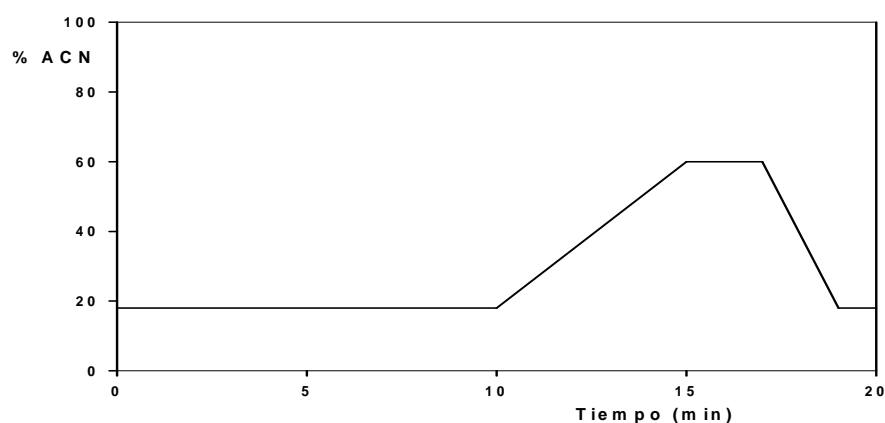


Figura 4. Gradiente de elución para la separación de las quinolonas. ACN: acetonitrilo

La composición del reactivo derivatizante es un aspecto importante en la optimización del método. Al igual que para los otros métodos para quinolonas incluidos en la Memoria, el pH adecuado para la formación de los quelatos lantánidos fue ligeramente ácido (alrededor de pH 6.0). El pH del eluido cromatográfico es bastante

ácido, por lo que se debe aumentar para poder observar la luminiscencia sensibilizada. Para ello, se eligió una disolución reguladora de acetato de amonio que pueda ajustar el pH del medio sin que precipite el hidróxido de terbio(III). La influencia de la concentración de terbio(III) se evaluó para cada uno de los complejos, y se observó que el área fue independiente de la concentración de terbio(III) a partir de 10 mmol l⁻¹. Una vez optimizado el sistema se establecieron sus características analíticas. En la Tabla 4 se muestran los tiempos de retención así como los LODs obtenidos para cada una de las quinolonas.

Tabla 4. Tiempos de retención y límites de detección para los métodos propuestos

Analito	Tiempo de retención, min	Modo tiempo	Modo
		resuelto	Fluorescencia
		LOD ⁽¹⁾	LOD ⁽¹⁾
Marbofloxacina	5.12	95.0	60.0
Ciprofloxacina	6.00	2.4	2.0
Danofloxacina	7.05	3.9	1.9
Enrofloxacina	8.18	2.5	2.2
Sarafloxacina	13.15	7.0	3.8
Difloxacina	14.43	4.2	4.0
Ácido oxolínico	16.85	4.0	2.3
Flumequina	18.62	40.0	2.7

⁽¹⁾Concentraciones expresadas en ng ml⁻¹

Se observa que los LODs en todos los casos son menores cuando se utiliza el modo de fluorescencia, al igual que para los métodos desarrollados para flumequina. La precisión de los métodos propuestos, expresada en desviación estándar relativa, se encontró entre los intervalos de 3.7 a 7.3 % para tiempo resuelto y 1.9 a 6.8 % para fluorescencia.

El método de LC con detección fluorescente se aplicó a la determinación de enrofloxacin, danofloxacin, ciprofloxacina y flumequina en tres muestras de leche distintas: entera, semidesnatada y desnatada. Se escogió el método cromatográfico con detección fluorescente debido a que el LOQ mediante medidas de tiempo resuelto es mayor que el límite de residuo máximo para la flumequina, lo que requeriría una etapa de preconcentración. No se ha propuesto la determinación de marbofloxacina debido a que el LOQ obtenido es superior al límite máximo de residuo (MRL) en las muestras analizadas. Otras quinolonas ensayadas, tales como el ácido oxolínico, difloxacina y sarafloxacina, no están permitidas en especies que producen leche, por lo que no se determinaron en estas muestras. No obstante, estos antibióticos se han separado para demostrar que el método propuesto no está interferido por otras quinolonas.

La utilidad práctica de los métodos cromatográficos se demostró mediante el análisis de diferentes muestras de tejidos animales y leche. Para ello se han de tener en cuenta los MRLs para cada antibiótico, los cuales dependen además de la muestra analizada. Se calcularon el límite de decisión ($CC\alpha$) y la capacidad de detección ($CC\beta$) de los métodos para flumequina y para las otras fluoroquinolonas en las distintas muestras ensayadas. $CC\alpha$ se define como la concentración de analito a partir de la que puede concluirse con un error α ($\alpha = 0.05$) que la muestra lo contiene por encima de los niveles permitidos. Para ello se analizaron 20 réplicas del blanco en presencia de la matriz de la muestra, a la que se le adicionaron los analitos a la concentración del MRL. $CC\alpha$ se calcula sumándole al MRL 1.64 veces la desviación estándar de las 20 repeticiones del análisis. $CC\beta$ equivale a la menor concentración de analito que puede ser detectada, identificada y/o cuantificada en la muestra con un error β ($\beta = 0.05$). La forma de calcular este parámetro es similar a la anterior, con la diferencia de que las muestras se fortifican a la concentración hallada para el límite de decisión.

En la Tabla 5 se resumen los valores de ambos parámetros para la determinación individual de flumequina y la simultánea de este antibiótico junto con otras quinolonas.

Nuevas estrategias metodológicas mediante iones lantánidos aplicables al análisis de rutina

Tabla 5. Valores del límite de decisión y capacidad de detección obtenidos para la determinación individual de flumequina y simultánea con otras quinolonas

Parámetros UE ⁽¹⁾	Tiempo resuelto		Fluorescencia		
	Músculo de pollo	Hígado de pollo	Músculo de pollo	Hígado de pollo	Leche entera
MRL	400	800	400	800	50
CC α	434	885	431	817	55
CC β	468	971	462	834	60

Parámetros UE ⁽¹⁾	Fluorescencia			
	Ciprofloxacina	Danofloxacina	Enrofloxacina	Flumequina
MRL	100	30	100	50
CC α	109.8	34.6	111.2	52.1
CC β	119.7	39.2	122.4	54.3

⁽¹⁾ $\mu\text{g kg}^{-1}$

El tratamiento de las muestras para los métodos de flumequina y las fluoroquinolonas consistió en una sencilla etapa de desproteinización. El estudio de las recuperaciones se realizó añadiendo diferentes concentraciones de los analitos a cada muestra. Los valores obtenidos se encuentran en los intervalos 95.0-103.8% para la determinación individual de flumequina y 93.3-106.0% para la determinación simultánea de las quinolonas ensayadas.

De los resultados aquí incluidos para la determinación de quinolonas, puede concluirse que las prestaciones analíticas de los métodos desarrollados son adecuadas para la determinación de estos antibióticos en análisis de rutina. La elevada sensibilidad y selectividad espectral y temporal de la luminiscencia sensibilizada de los quelatos lantánidos puede permitir el desarrollo de métodos de selección para estos compuestos. Cuando el objetivo es la determinación de cada compuesto, debe incluirse una etapa de separación cromatográfica previa para lograr una selectividad adecuada.

Compuestos fenólicos

El sistema cromatográfico anteriormente descrito se utilizó para la separación y determinación de una serie de compuestos fenólicos, tales como, ácido gálico, ácido protocatecuico, catequina, ácido vanílico, p-hidroxibenzoico, ácido siríngico, epicatequina y ácido salicílico, midiendo la fluorescencia de sus complejos con el ión terbio(III).

Todos estos analitos poseen fluorescencia nativa, con longitudes de onda de excitación y emisión diferentes, como se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6. Características fluorescentes de compuestos fenólicos

Compuesto	λ_{ex}	λ_{em}
Ácido gálico	291	359
Ácido protocatecuico	297	353
Catequina	283	311
Ácido vanílico	295	351
Ácido p-hidroxibenzoico	277	310
Ácido siríngico	292	355
Epicatequina	283	313
Ácido salicílico	299	405

Como puede observarse, las longitudes de onda de emisión varían en el intervalo 310-405 nm, lo que requeriría seleccionar los valores adecuados de emisión para cada pico cromatográfico. La formación de los quelatos de terbio(III) ofrece la ventaja adicional de que la emisión de todos los picos cromatográficos se produce a 545 nm, que es característica para este lantánido, evitando la necesidad de modificar las condiciones instrumentales. Las longitudes de onda de excitación para estos compuestos varían entre 283 y 299 nm, lo que permite seleccionar 295 nm como solución de compromiso ya que el intervalo de variación es suficientemente estrecho.

En el apartado II.7. se muestran las estructuras químicas de los compuestos fenólicos estudiados en esta Memoria. Como puede observarse, los ácidos gálico, protocatecuico, vanílico, p-hidroxibenzoico, siríngico y salicílico poseen dos grupos funcionales

disponibles para formar el complejo con el ión terbio(III). Catequina y epicatequina sólo poseen grupos hidroxilo para la formación del quelato, por lo que se requiere un medio alcalino para que estos grupos desprotonados reaccionen con el ión terbio(III).

A diferencia de los métodos basados en LC propuestos para estos compuestos y que aparecen citados en el correspondiente trabajo de investigación, se eligió un porcentaje de ácido acético diez veces menor (0.2%) ya que se obtiene una buena separación y, además, se puede aumentar el pH del eluido cromatográfico hasta alcanzar el medio alcalino requerido de forma relativamente fácil. Para conseguir la separación de los compuestos se utilizó el gradiente que aparece en la Figura 5, consiguiendo la separación de los analitos en 58 minutos.

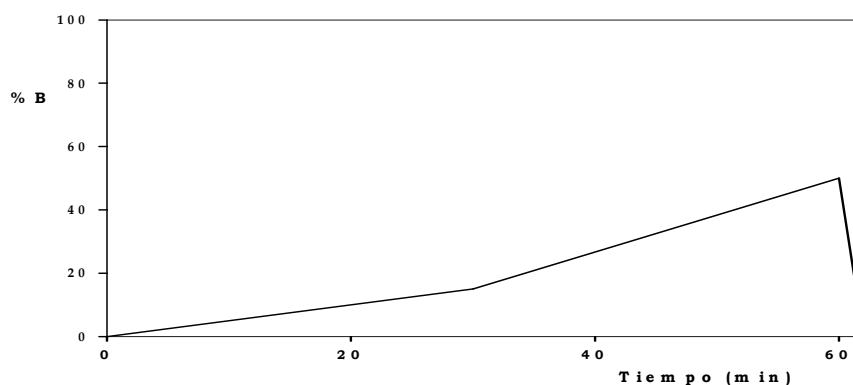


Figura 5. Gradiente utilizado para la separación de los compuestos fenólicos. B metanol:ácido acético (90:10) (0.2%; pH 3.4)

En lo referente al reactivo derivatizante, las variables optimizadas fueron el pH y las concentraciones de terbio(III) y de AEDT. El pH es una variable crítica en este sistema, debido a que es necesario un medio básico para favorecer la formación de los complejos entre el ión terbio y los compuestos fenólicos. El pH del reactivo derivatizante fue 13.20, ajustado con hidróxido sódico 0.14 mol l^{-1} . El pH de la mezcla resultante, medido en el desecho, fue 12.5. Para que el terbio(III) no precipitara se requirió la adición de AEDT, que se estudió entre los valores de 10^{-2} y $4 \times 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$, observándose que a concentraciones menores de $10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$ precipita el terbio(III).

Anteriormente se ha descrito que el CTAB incrementa la señal luminiscente para el ácido salicílico [10]. La influencia de este tensoactivo se estudió a concentraciones por encima y por debajo de su concentración micelar crítica (c.m.c.), encontrando que a concentraciones bajas no ejercía ninguna influencia en la señal luminiscente, mientras que a concentraciones por encima de la c.m.c. precipitaba. El TOPO también fue ensayado en el intervalo $10 - 60 \mu\text{mol l}^{-1}$, sin que se observara ninguna influencia en la luminiscencia del sistema.

Los tiempos de retención, los intervalos de linealidad y los LODs para estos sistemas, se muestran en la Tabla 7. Los LODs se calcularon según las recomendaciones de la IUPAC, obteniendo

unos valores comparables o, en algunos casos, menores que los descritos por otros métodos de cromatografía líquida con detección ultravioleta [11-15] o detección fluorimétrica [14].

Tabla 7. Características analíticas del método propuesto

Compuesto	Tiempo de retención (min) (%RSD) ^a	Intervalo lineal ^b	LOD ^b
Ácido gálico	9.23 (1)	0.9-40	0.3
Ácido protocatecuico	17.70 (2.6)	0.05-7	0.016
Catequina	28.75 (2.4)	0.2-40	0.07
Ácido vanílico	35.93 (1.8)	0.35-40	0.08
Ácido p-hidroxibenzoico	38.17 (1.3)	0.8-40	0.25
Ácido sirínico	40.88 (1.5)	0.17-40	0.05
Epicatequina	43.35 (1.5)	0.3-40	0.09
Ácido salicílico	57.8 (1.2)	0.07-12	0.02

^a(n=9, entre días)

^bUnidades: $\mu\text{g ml}^{-1}$

El método propuesto se aplicó al análisis de vinos, utilizando para ello dos variedades de vino blanco. Como puede observarse en el apartado II.7, el ácido protocatecuico estaba presente en ambas muestras, mientras que el salicílico solamente en uno de los vinos. En todos los sistemas se obtuvieron unas recuperaciones muy satisfactorias comprendidas entre el 93.3 y el 108.0%.

Uso del ión iterbio(III) como reactivo a larga longitud de onda

Aunque la formación de los complejos de iterbio(III) con los iones sulfito y fosfato se ha descrito con anterioridad [16], es la primera vez que se utiliza este ión con fines analíticos para determinar estos aniones. También se propone por primera vez la medida dinámica a larga longitud de onda de la turbidez originada por los compuestos formados.

Se realizaron varios estudios cinéticos del comportamiento de los iones sulfitos con diferentes iones lantánidos, midiendo la variación de la dispersión de la radiación con el tiempo. Los mejores resultados se obtuvieron con el ión iterbio(III), a un pH cercano a la formación de su hidróxido. Para confirmar la formación del complejo con sulfitos, el precipitado blanco formado se analizó mediante difracción de electrones por rayos-X (EDAX) y espectroscopia IR. La Figura 6 muestra los resultados del análisis EDAX en el que se observa la presencia de iterbio(III), azufre y oxígeno en dicho precipitado.

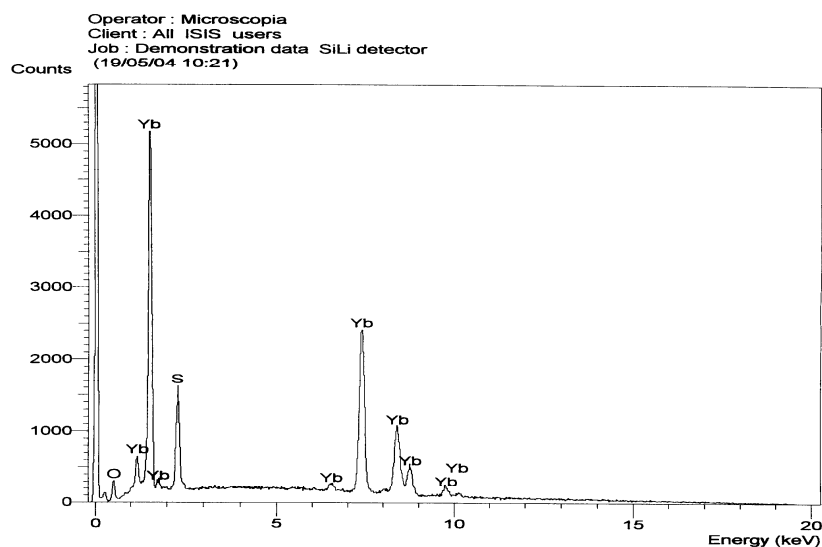


Figura 6. Espectros obtenidos mediante EDAX para el precipitado debido al complejo iterbio(III)-sulfitos

En el espectro de IR (Figura 7), puede observarse una banda intensa a 3407 cm^{-1} debida a la vibración de los grupos hidroxilos y del enlace S-O. La banda que aparece a 1130 cm^{-1} es característica de los iones sulfatos, que podrían deberse a la posible oxidación de los sulfitos, debido al carácter oxidante de los iones iterbio(III), mientras que las existentes a 1013 y 631 cm^{-1} se deben a la presencia de sulfitos. Las bandas comprendidas entre 1384 y 1643 cm^{-1} pueden atribuirse a los iones nitrato, debido a que el reactivo de iterbio es una sal que contiene dicho anión.

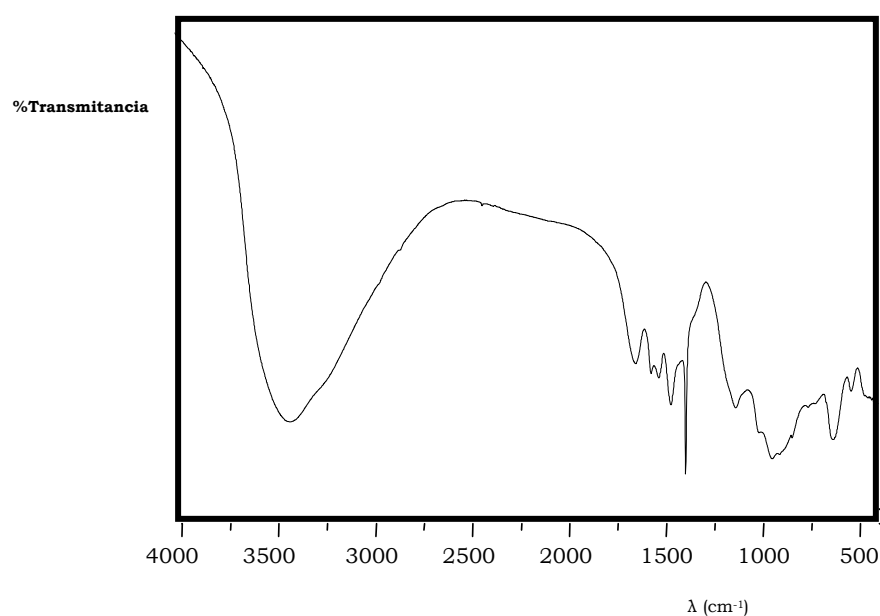


Figura 7. Espectro IR del precipitado obtenido por reacción del iterbio(III) con los iones sulfito

El complejo de fosfato se ha caracterizado mediante difracción de rayos-X y espectroscopia de IR y Raman [16].

El uso de un espectrofluorímetro permitió medir la variación de la dispersión de la radiación con el tiempo, utilizando la velocidad inicial de esta reacción como parámetro analítico. Debido a su rapidez, la adición de los reactantes se automatizó mediante la técnica de mezcla de flujo detenido, que permite la obtención de las curvas cinéticas desde el instante inicial de la mezcla. Se aplicó el método

de velocidad inicial y las medidas se obtuvieron en 0.5 segundos para ambos sistemas. Además, para los iones sulfito se realizaron medidas en el equilibrio a los 10 s a partir de las curvas cinéticas obtenidas, con objeto de comparar las características del correspondiente método estático con las del método dinámico.

Las longitudes de onda óptimas de excitación (λ_{ex}) y de emisión (λ_{em}) del instrumento se seleccionaron mediante la obtención de un “espectro” sincrónico en el que $\lambda_{ex}=\lambda_{em}$. La mayor intensidad de la radiación dispersada y también los mejores valores de velocidad inicial se obtuvieron a 490 nm. Como ya se ha comentado en la introducción de este capítulo, cuando se realizan medidas de dispersión de la radiación, se utiliza generalmente la misma longitud de onda para la excitación y la emisión. No obstante, la obtención de la intensidad de la radiación dispersada a 980 nm, aprovechando el efecto de segundo orden de la red de difracción, permite conseguir medidas de dispersión más selectivas. De esta forma, se minimizan las interferencias de sustancias que emiten a longitudes de onda próximas a 490 nm.

Debido a que la composición del medio puede influir en la velocidad de formación de los complejos de los iones lantánidos, se ensayó la influencia de distintos disolventes en los sistemas de

Nuevas estrategias metodológicas mediante iones lantánidos aplicables al análisis de rutina

sulfito y fosfato. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 8 donde puede observarse que el medio acuoso fue el más adecuado para el desarrollo de ambos métodos.

Tabla 8. Influencia del medio en los sistemas estudiados

Disolvente	Velocidad inicial (%) Iterbio(III)-Sulfito	Velocidad inicial (%) Iterbio(III)-Fosfato
Agua	100.0	100.0
Etanol	80.2	88.8
Dimetilsulfóxido	70.4	33.1
Dimetilformamida	67.3	61.8
Acetonitrilo	63.0	85.1
Etilenglicol	55.1	75.2
2-Propanol	37.7	43.2
Acetona	37.7	79.5
Metanol	35.4	51.1
Alcohol Polivinílico	28.4	62.6
Ciclodextrina	7.8	61.3
Gelatina	0.0	0.0

El porcentaje de cada disolvente fue del 10% exceptuando el ácido polivinílico y la ciclodextrina que fue del 0.67%

Se estudió la influencia de diversos tensoactivos como CTAB, SDS o Triton X-100, por encima y por debajo de su concentración micelar crítica, encontrando que los mejores resultados se obtuvieron en ausencia de estos compuestos.

La optimización de las variables experimentales del sistema químico de sulfitos se realizó mediante el método univariante. Para optimizar el sistema correspondiente a fosfatos se compararon los resultados obtenidos mediante el método univariante con los proporcionados mediante un método multivariante, basado en diseño experimental.

La optimización del pH se realizó estudiando su influencia en cada una de las disoluciones que se introducen en las jeringas. El pH de la disolución de reactivo es una variable crítica que debe controlarse eficazmente ya que su intervalo óptimo es muy estrecho. El intervalo óptimo de pH para las disoluciones de estándares o muestras es más amplio (aproximadamente 8.9-10.0) para ambos sistemas. El pH de la mezcla, medido en el desecho, tuvo un valor de 6.4-6.6, que puede atribuirse a la reacción de hidrólisis del exceso de iterbio. El estudio de la influencia de la concentración de iterbio(III) mostró que la velocidad inicial de los sistemas fue independiente de esta variable en el intervalo $1.8\text{-}2.7 \times 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$.

Para realizar la optimización multivariante en el sistema del fosfato se aplicó un diseño central compuesto (CCD) utilizando la metodología de superficie de respuesta, donde las dos variables críticas del sistema eran la concentración de iterbio(III) y el pH de la

muestra. Estas variables se denominan factores y cada uno de ellos se ensayó a cinco niveles, por lo que se requirieron 10 experimentos para diseñar el CCD. El pH de la disolución de iterbio(III) no se tuvo en cuenta en este diseño factorial ya que, como se ha comentado, su intervalo óptimo es muy estrecho, disminuyendo bruscamente la velocidad inicial a valores de pH superiores e inferiores. Las tablas con los resultados obtenidos para esta optimización pueden verse en el Capítulo III.

Las tres respuestas medidas fueron el pH de la mezcla de reacción en ausencia de fosfatos (R_1), el pH de la reacción en presencia de fosfatos (R_2), que se midieron en el desecho, y la velocidad inicial del sistema (R_3), para cada uno de los dos factores. Tras la aplicación de este diseño, se encontraron los valores óptimos para ambos. La Figura 8 muestra la localización del punto estacionario, que corresponde a un valor de la concentración de iterbio(III) de 25.5 mmol l^{-1} y un pH de la disolución de fosfato de 9,11.

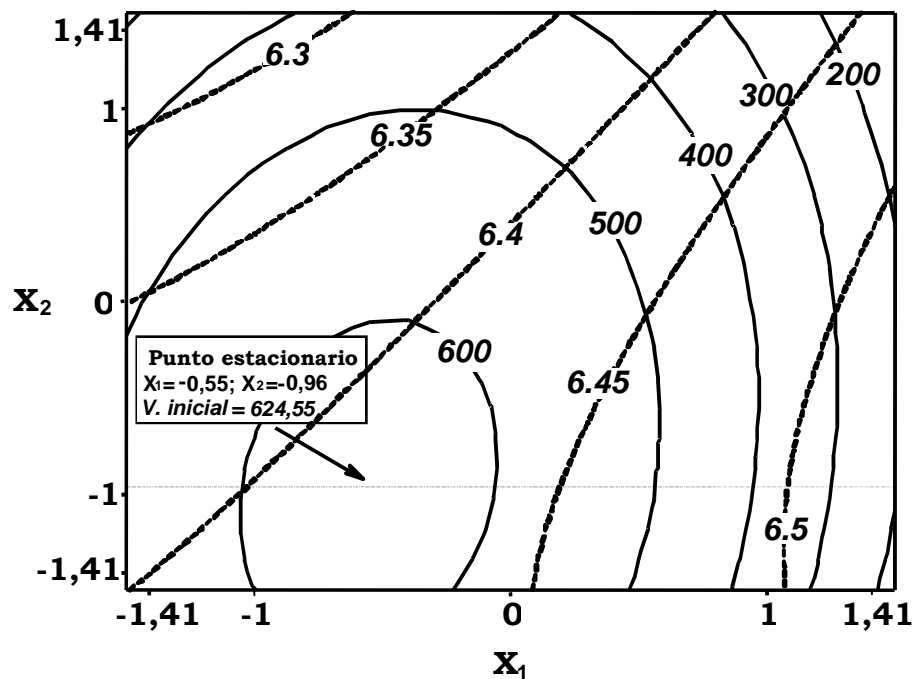


Figura 8. Localización del punto estacionario mediante el diseño experimental seleccionado

Los resultados obtenidos mediante este método coincidieron con los proporcionados por el método univariante, debido a que las variables son independientes. Por tanto, puede concluirse que la aplicación del método univariante para la optimización se realizó correctamente.

Nuevas estrategias metodológicas mediante iones lantánidos aplicables al análisis de rutina

En la Tabla 9, se resumen las características analíticas para la determinación de sulfitos mediante medidas de velocidad inicial y en el equilibrio.

Tabla 9. Comparación de los métodos cinético y de equilibrio

	CINÉTICO	EQUILIBRIO
Tiempo de medida (s)	0.5 s	10 s
Intervalo de linealidad ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	1-250	6.4-100
Ecuación recta de calibrado	$(2.2 \pm 2.1) 10^{-4} + (4.6 \pm 0.2) 10^{-3} x$	$4.9 10^{-2} + 2.6 10^{-2} x$
r	0.996	0.998
LOD ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	0.35	1.9
LOQ ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	1.0	6.4
Precisión (% RSD)		
20 $\mu\text{g ml}^{-1}$	5.8	10.0
100 $\mu\text{g ml}^{-1}$	1.2	7.5

Como puede observarse, el límite de detección obtenido utilizando medidas cinéticas fue aproximadamente 5 veces menor que el obtenido con las medidas en el equilibrio. La mejor sensibilidad, mayor rapidez y mejor selectividad del método cinético justifican su elección para abordar la determinación de sulfitos en muestras de vino.

En la Tabla 10 se resumen las características analíticas para la determinación de fosfatos.

Tabla 10. Características analíticas del sistema iterbio-fosfato

Intervalo de linealidad (mmol l ⁻¹)	0.09 -7.9	
Ecuación recta de calibrado	$-(8 \pm 10) + (120.3 \pm 0.7) x$	
r	0.9999	
LOD (mmol l ⁻¹)	0.03	
LOQ (mmol l ⁻¹)	0.09	
Precisión %	0.50 mmol l ⁻¹	2.32
	1.00 mmol l ⁻¹	0.69

Ambos métodos se aplicaron al análisis de muestras reales y se validaron mediante su comparación con métodos oficiales y estudios de recuperación. Los sulfitos totales se determinaron en ocho muestras de vino diferentes, a las que se midió el pH, y la acidez total valorable. El método propuesto se comparó con el método de la p-rosanilina, que puede considerarse oficial para la determinación de sulfitos en frutas y para el que su aplicación en vinos también ha sido aceptada. Los resultados obtenidos pueden verse en la Tabla 11.

Nuevas estrategias metodológicas mediante iones lantánidos aplicables al análisis de rutina

Tabla 11. Análisis de muestras de vino blanco

Muestra	pH	Acidez total valorable	Concentración de sulfitos ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	
			Método p-rosanilina ^b	Método propuesto ^b
1	3.01	3.88	36.7 \pm 0.1	33 \pm 2
2	3.06	5.02	44.03 \pm 0.03	45 \pm 4
3	3.04	5.54	327.1 \pm 0.2	331 \pm 6
4	3.02	5.18	176.46 \pm 0.05	185 \pm 10
5	2.95	5.54	23.63 \pm 0.02	29.36 \pm 0.04
6	3.12	4.82	34.26 \pm 0.02	33.47 \pm 0.03
7	3.08	6.77	113.5 \pm 0.1	117.07 \pm 0.2
8	3.18	4.77	104.64 \pm 0.07	103.96 \pm 0.07

^aUnidades: g ácido tartárico/l

^bMedia \pm SD (n = 5)

La Tabla 12 muestra los resultados obtenidos para la determinación de fosfatos en muestras de agua potable, de pozo y de río. Los resultados obtenidos se compararon con el método oficial basado en la formación del azul de molibdeno.

Tabla 12. Determinación de fosfatos en muestras de agua

Muestra	Contenido ($\mu\text{mol l}^{-1}$)	
	Método fotométrico ^a	Método propuesto ^a
Agua de grifo	0.22 \pm 0.02	0.25 \pm 0.06
Agua de pozo	0.42 \pm 0.02	0.43 \pm 0.03
Agua de río	0.41 \pm 0.02	0.40 \pm 0.02

^aMedia \pm SD (n=5)

El test de la t por parejas se aplicó a los resultados obtenidos con los métodos propuestos y oficiales, observándose que no existieron diferencias significativas. Los resultados de los estudios de recuperación proporcionaron los intervalos de recuperación 96.0-106.7% para los sulfitos, y 97.5-102.5% para los fosfatos.

ASPECTOS DESTACABLES DE LAS INVESTIGACIONES REALIZADAS

Como resumen de este capítulo, se exponen a continuación de forma sucinta las aportaciones más relevantes de las investigaciones recogidas en esta Memoria.

La tecnología de reactivos secos es una opción muy útil y ampliamente aceptada en análisis de rutina debido a sus características de rapidez y simplicidad. Como alternativa a los reactivos de tipo bioquímico como enzimas y anticuerpos, que son los más utilizados en esta tecnología, se propone en el capítulo I el uso de iones lantánidos, los cuales ofrecen una mayor estabilidad y simplicidad para su inmovilización en el soporte sólido. La utilización conjunta de dos lantánidos que reaccionan selectivamente con dos tipos distintos de compuestos, permite de forma muy simple la determinación directa de éstos. La resolución espectral conseguida

es debida a las estrechas bandas de emisión de los iones lantánidos, como resultado de la luminiscencia sensibilizada producida, que evitan el solapamiento de las correspondientes señales analíticas. La utilidad práctica del sistema propuesto, mediante la inmovilización de los iones terbio(III) y europio(III), se ha demostrado para la determinación de dos componentes representativos de dos familias de antibióticos, fluoroquinolonas y tetraciclinas, aunque puede extenderse fácilmente como método de selección para la determinación de otros componentes de estos grupos de antibióticos.

El capítulo II se ha dedicado exclusivamente al estudio de la capacidad derivatizante del terbio(III) en disolución con objeto de desarrollar métodos directos y cromatográficos para la determinación de antibióticos quinolonas y derivados fenólicos. La elección de estos compuestos se ha debido a que su estructura es especialmente adecuada para originar la luminiscencia sensibilizada de este lantánido. El estudio realizado ha permitido el establecimiento de determinaciones muy sensibles en las que se evita la inclusión de etapas previas de preconcentración, las cuales son frecuentemente necesarias en otras determinaciones descritas para estos compuestos.

La investigación sistemática realizada con diez fluoroquinolonas ha demostrado que pueden alcanzarse LODs muy bajos para la mayoría de estos antibióticos, utilizando los modos fluorescencia o tiempo resuelto. El estudio de los sistemas de terbio con ciprofloxacina y con flumequina mostró que el modo tiempo resuelto permite obtener un LOD menor para ciprofloxacina, mientras que se obtiene un valor más bajo para flumequina con el modo fluorescencia. La utilidad práctica de estos sistemas para la determinación directa de una fluoroquinolona se ha puesto de manifiesto mediante su aplicación a la determinación de ciprofloxacina en leche, la cual sólo requiere la desproteinización de las muestras con acetonitrilo.

Debido al similar comportamiento luminiscente de estos antibióticos con el terbio, la determinación directa de uno de ellos tiene utilidad cuando se conoce que es el único que se encuentra en la muestra y la finalidad del análisis es su cuantificación. En caso que puedan existir mezclas de quinolonas, es necesario recurrir a la separación cromatográfica para mejorar la selectividad de estos sistemas. Con este fin se ha estudiado en esta Memoria la determinación individual de flumequina y simultánea de mezclas de quinolonas en alimentos, utilizando la derivatización post-columna con terbio, la cual se realiza de forma automática. A diferencia de

otros métodos cromatográficos descritos para la determinación de estos compuestos, que requieren tratamientos complejos de las muestras, los métodos propuestos ofrecen mayor simplicidad ya que sólo es necesaria la desproteínización previa.

En esta Memoria se describe por primera vez la utilidad de la luminiscencia sensibilizada del terbio como sistema de detección para la determinación cromatográfica de mezclas de compuestos fenólicos, los cuales pueden encontrarse de forma natural en productos de origen vegetal como es el vino. Los métodos cromatográficos descritos para la determinación de estos compuestos implican generalmente una etapa de extracción en fase sólida para evitar las interferencias debidas a la matriz de la muestra. Por el contrario, el método propuesto, en el que se estudia la determinación de ocho compuestos fenólicos, únicamente requiere la dilución de la muestra para su análisis.

Un objetivo que se consideró en el planteamiento inicial de las investigaciones que han dado lugar a esta Memoria fue estudiar el potencial analítico de iones lantánidos distintos al terbio(III) y al europio(III). Se realizaron diversos ensayos con iterbio(III), neodimio(III) y erbio(III), con objeto de utilizar con fines analíticos la luminiscencia a larga longitud de onda de sus quelatos. No obstante,

su gran dependencia con factores como el oxígeno disuelto y las vibraciones oscilantes de los grupos hidroxilos hizo necesario desistir de este estudio ya que las señales luminiscentes obtenidas no presentaban las características necesarias. Aunque estos ensayos previos fueron infructuosos para el análisis luminiscente, han permitido el desarrollo de una nueva metodología muy simple y rápida basada en medidas dinámicas de dispersión a larga longitud de onda utilizando la técnica de mezcla de flujo detenido. En el capítulo III se presentan los resultados obtenidos al aplicar esta metodología a la determinación de sulfito y fosfato. El método propuesto para la determinación de sulfitos en vinos puede ser una alternativa útil frente a los métodos convencionales que requieren una etapa de destilación o el uso de reactivos tóxicos. La determinación de fosfatos propuesta implica una etapa previa de preconcentración para el análisis de muestras de agua, la cual es también normalmente necesaria en otros métodos para fosfatos. No obstante, la etapa determinativa es más rápida que en estos métodos, ya que la medida se realiza en décimas de segundo.

Considerando globalmente los resultados obtenidos, puede deducirse que se ha alcanzado el objetivo básico inicialmente propuesto, referente al desarrollo de métodos analíticos sensibles y selectivos, fácilmente aplicables al análisis de rutina. Todos los

métodos descritos en esta Memoria han demostrado su utilidad práctica mediante su aplicación a distintas áreas, tales como el análisis clínico, ambiental y de alimentos, analizando muestras de orina y suero humanos, aguas, vinos, leche y carne. Las determinaciones propuestas se caracterizan, en general, por su escasa necesidad de recurrir a etapas previas lentas y complejas para el tratamiento de las muestras analizadas. Las muestras clínicas y algunas de las muestras de alimentos analizadas mediante los métodos propuestos sólo han requerido una simple etapa previa de desproteínización y, para la determinación de fosfatos en aguas, se incluye una etapa muy rápida de preconcentración mediante cambio iónico.

La sensibilidad, selectividad y rapidez de los métodos desarrollados son el resultado de la combinación de diversas herramientas analíticas, tales como derivatización, luminiscencia sensibilizada, tiempo resuelto, dispersión, reactivos secos y sistemas dinámicos. Puede concluirse que, además de permitir obtener los resultados científicos descritos, el uso de esta variedad de herramientas ha contribuido a la formación investigadora del doctorando, que es también un objetivo básico cuando se realiza una Tesis Doctoral.

REFERENCIAS

1. A.M. Casas-Hernández, M.P. Aguilar-Caballos, A. Gómez-Hens, *Anal. Chim. Acta* 452 (2002) 169.
2. G.L. Long, J.D. Winefordner, *Anal. Chem.* 55 (1983) 712A.
3. *Martindale Extra Pharmacopoeia*, J. Reynolds Ed., 31st edition, 1996, Pharmaceutical Press, London.
4. J.A. Hernández-Arteseros, R. Compañó, M.D. Prat, *Analyst* 123 (1998) 2729.
5. J.A. Hernández-Arteseros, R. Compañó, R. Ferrer, M.D. Prat, *Analyst* 125 (2000) 1155.
6. J.A. Ocaña, M. Callejón, F.J. Barragán, *Analyst* 125 (2000) 1851.
7. A. Rieutord, L. Vázquez, M. Soursac, P. Prognon, J. Blais, P. Bourget, G. Mahuzier, *Anal. Chim. Acta* 290 (1994) 215.
8. C.J. Veiopoulou, P.C. Ioannou, E.S. Lianidou, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 15 (1997) 1839.
9. A. Rieutord, P. Prognon, F. Brion, G. Mahuzier, *Analyst* 122 (1997) 59R.
10. S. Panadero, A. Gómez-Hens, D. Pérez-Bendito. *Anal. Chim. Acta* 329 (1996) 135.
11. R. Sladkovský, P. Solich, M. Urbánek, *J. Chromatogr. A* 1040 (2004) 179.

Nuevas estrategias metodológicas mediante iones lantánidos aplicables al análisis de rutina

12. M. Castellari, E. Sartini, A. Fabiani, G. Arfelli, A. Amati, J. Chromatogr. A 973 (2002) 221.
13. M. del Álamo, L. Casado, V. Hernández, J.J. Jiménez, J. Chromatogr. A 1094 (2004) 97.
14. M.A. Rodríguez-Delgado, S. Malovaná, J.P. Pérez, T. Borges, F.J. García-Montelongo, J. Chromatogr. A 912 (2001) 249.
15. M. Del Álamo-Sanza, I. Nevares-Domínguez, L.M. Cárcel-Cárcel, L. Navas-Gracia, Anal. Chim. Acta 513 (2004) 229.
16. H. Assaaoudi, A. Ennaciri, A. Rulmont, Vib. Spectrosc., 25 (2001) 81.

CONCLUSIONES

Nuevas estrategias metodológicas mediante iones lantánidos aplicables al análisis de rutina

Los resultados obtenidos en la investigación desarrollada en esta Memoria han contribuido a ampliar la aplicabilidad de los iones lantánidos como reactivos analíticos en disolución y en el formato de reactivos secos. A partir de estos resultados pueden extraerse las siguientes conclusiones:

- Se demuestra la utilidad de la inmovilización simultánea de los iones terbio(III) y europio(III) en tiras de celulosa tratadas con sacarosa para la determinación de los antibióticos ciprofloxacina y tetraciclina y su aplicación en análisis de rutina de fluidos biológicos. Las características luminiscentes de los quelatos formados ofrecen la selectividad necesaria para la resolución de la mezcla, evitando el uso de separaciones físicas y tratamientos matemáticos.
- El estudio sistemático de la luminiscencia sensibilizada de terbio(III) originada en disolución por distintos antibióticos quinolona ha dado lugar a los siguientes resultados:
 - Se propone la determinación directa de ciprofloxacina en muestras de leche mediante medidas en el modo de tiempo resuelto.

Nuevas estrategias metodológicas mediante iones lantánidos aplicables al análisis de rutina

- Se estudia la utilidad de este ión lantánido como reactivo derivatizante en cromatografía líquida para la determinación individual y de mezclas de quinolonas.
- Se describe la determinación simultánea de ocho compuestos fenólicos en vino blanco mediante cromatografía líquida y derivatización post-columna con terbio(III).
- Se demuestra la utilidad del iterbio(III) como reactivo analítico mediante el desarrollo de métodos simples, rápidos y semiautomáticos para la determinación de sulfitos y fosfatos en vinos y aguas, respectivamente. La medida dinámica a larga longitud de onda de la dispersión de la radiación permite minimizar interferencias de la matriz de la muestra, que se originan a longitudes de onda menores.
- Los elevados niveles de sensibilidad y selectividad de los métodos desarrollados han posibilitado el análisis de muestras complejas utilizando sólo tratamientos previos sencillos. Los métodos propuestos han sido validados mediante estudios de recuperación y/o comparación con métodos oficiales para demostrar su utilidad en el análisis de muestras reales con resultados satisfactorios.