

UNIVERSIDAD DE GRANADA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA



TIRAS REACTIVAS ÓPTICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE
METALES PESADOS

TESIS DOCTORAL

CLARA CANO RAYA
GRANADA, 2005

**TIRAS REACTIVAS ÓPTICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE
METALES PESADOS**

por

CLARA CANO RAYA

**Departamento de Química Analítica
Universidad de Granada**

VISADO en Granada, a 17 de Marzo
de 2005

MEMORIA presentada para aspirar
al Grado de Doctor en Ciencias
Químicas.
Granada, a 17 de Marzo de 2005

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

Fdo.- **Clara Cano Raya**, Licenciada
en Ciencias. Sección Químicas.

Prof. Dr. Dña. **Mª Dolores Fernández
Ramos**, Profesora Titular del
Departamento de Química Analítica

La presente Tesis Doctoral se ha realizado en el grupo de investigación de la Universidad de Granada, “Espectrometría en Fase Sólida” (FQM-118) del Departamento de Química Analítica, bajo la dirección de los Drs. D. Luis Fermín Capitán Vallvey y Dña. María Dolores Fernández Ramos.

La financiación necesaria ha corrido a cargo de dos proyectos financiados por el Ministerio de Educación y Cultura, Dirección General de Enseñanza Superior (Proyecto N° PB98-1302) y (Proyecto N° BQU2002-00353). Y a cargo de una beca de Formación de Profesorado Universitario del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (Ref: AP-2000-0732).

Queremos agradecer la ayuda prestada al Vicerrectorado de Investigación de la Universidad de Granada.

ÍNDICE

OBJETIVOS DE LA TESIS.....	1
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN.....	5
CAPITULO 2. BASES FÍSICO - QUÍMICAS.....	21
1. Técnicas de medida.....	23
1.1. Absorción de radiación.....	23
1.1.1. Método de medida.....	24
1.1. Luminiscencia.....	25
1.2.1. Tiempo de vida.....	27
1.2.2. Rendimiento cuántico.....	27
1.2.3. Transferencia de energía de resonancia (RET).....	29
1.2.3.1. Cálculo de parámetros RET.....	30
1.2.4. Atenuación de luminiscencia.....	32
1.2.5. Métodos de medida.....	34
2. Método de preparación de los sensores de un solo uso.....	36
2.1. Características físicas.....	36
2.1.1. Preparación de los sensores.....	36
CAPITULO 3. DETERMINACIÓN DE COBRE EN PLASMA MEDIANTE UN SENSOR ÓPTICO DE UN SOLO USO.....	41
1. Introducción.....	44
2. Experimental.....	47
2.1. Instrumentación y software.....	47
2.2. Reactivos y materiales.....	48
2.3. Preparación de la membrana.....	48
2.4. Medida de absorbancia.....	49

2.5.	Procedimiento propuesto para muestras y patrones	49
3.	Resultados y discusión.	50
3.1.	Composición de la membrana.....	50
3.2.	Parámetros relacionados con el proceso de equilibrio	53
3.3.	Influencia de la concentración de cobre.....	55
3.4.	Parámetros analíticos	59
3.5.	Selectividad.....	61
3.6.	Aplicaciones y validación	62
4.	Conclusiones.....	63
CAPITULO 4. DETERMINACIÓN DE COBRE EN AGUA MEDIANTE UN SENSOR ÓPTICO DE UN SOLO USO BASADO EN TRANSFERENCIA DE ENERGÍA DE RESONANCIA		67
1.	Introducción.	70
2.	Experimental.	72
2.1.	Instrumentación y software.....	72
2.2.	Reactivos y materiales	74
2.3.	Preparación de la membrana sensora y sistema de medida.....	74
2.4.	Cálculos	75
3.	Resultados y discusión.	76
3.1.	Esquema de sensado	76
3.2.	Optimización de la respuesta del sensor	82
3.2.1.	Composición de la membrana.....	82
3.2.2.	Parámetros relacionados con el proceso de equilibrio.	86
3.3.	Parámetros analíticos	90
3.4.	Aplicaciones y validación	93
4.	Conclusiones.....	94

CAPITULO 5. DETERMINACIÓN DE MERCURIO EN AGUA MEDIANTE UN SENSOR ÓPTICO IRREVERSIBLE BASADO EN EL USO DE UN IONÓFORO NEUTRO	99
1. Introducción.....	102
2. Esquema de sensado.....	104
3. Experimental.....	109
3.1. Instrumentación y software.....	109
3.2. Reactivos y materiales	109
3.3. Preparación de la membrana.....	110
3.4. Medida de absorbancia	111
3.5. Procedimiento propuesto para muestras y patrones.....	111
3.5.1. Procedimiento para 5 minutos de equilibración.	111
3.5.2. Procedimiento para 60 minutos de equilibración.....	112
4. Resultados y discusión.....	112
4.1. Composición de la membrana	112
4.2. Parámetros relacionados con el proceso de equilibrio	118
4.3. Parámetros analíticos	120
4.4. Aplicaciones y validación.....	122
5. Conclusiones.....	123
CAPITULO 6. DETERMINACIÓN DE MERCURIO MEDIANTE UN SENSOR ÓPTICO DE UN SOLO USO BASADO EN LA DESCOMPOSICIÓN DE TETRAARILBORATO	127
1. Introducción.....	130
2. Experimental.....	132
2.1. Reactivos y materiales	132

2.2.	Instrumentación y software.....	133
2.3.	Preparación de la membrana sensora y sistema de medida.....	134
2.4.	Cálculos	135
3.	Resultados y discusión.....	135
3.1.	Esquema de sensado	135
3.2.	Optimización de la respuesta del sensor	137
3.2.1.	Composición de la membrana.....	137
3.2.2.	Parámetros de reacción.	141
3.3.	Mecanismo de respuesta	142
3.4.	Parámetros analíticos	145
4.	Conclusiones.....	148
CAPITULO 7. ATENUACIÓN DE FLUORESCENCIA DEL COMPLEJO EUROPIO-TETRACICLINA-PERÓXIDO DE HIDRÓGENO POR COBRE Y OTROS IONES METÁLICOS.....		153
1.	Introducción.....	156
2.	Experimental.....	158
2.1.	Reactivos y materiales	158
2.2.	Instrumentación y software.....	159
2.3.	Procedimiento	159
2.4.	Procedimiento de referencia	160
3.	Resultados y discusión.....	160
3.1.	Fundamento teórico	160
3.2.	Parámetros experimentales	162
3.3.	Detección de la intensidad de luminiscencia	164
3.4.	Medidas de tiempo de vida de luminiscencia	164

3.5. Ensayo para determinación de cobre mediante intensidad de fluorescencia en tiempo resuelto	172
3.6. Ensayo RLD para la determinación de cobre	172
3.7. Interferencias de otras especies metálicas.....	173
3.8. Validación del ensayo para cobre en muestras de agua	175
4. Conclusiones.....	176
ANEXO I.....	179
CONCLUSIONES	197
PUBLICACIONES.....	203

OBJETIVOS

OBJETIVOS DE LA TESIS

1	Identificar los factores que influyen en el desarrollo de la enfermedad.	2	Analizar el impacto de la enfermedad en la calidad de vida de los pacientes.
2	Estudiar el efecto de los tratamientos disponibles en la evolución de la enfermedad.	3	Evaluar la efectividad de los tratamientos en la reducción de la mortalidad.
3	Analizar el papel de los factores genéticos en el desarrollo de la enfermedad.	4	Estudiar el efecto de los factores ambientales en el desarrollo de la enfermedad.
4	Analizar el efecto de los factores ambientales en el desarrollo de la enfermedad.	5	Estudiar el efecto de los factores genéticos en el desarrollo de la enfermedad.
5	Analizar el efecto de los factores genéticos en el desarrollo de la enfermedad.		

0123456789
d

6 123456789
0123456789

0123456789

7 0123456789
0123456789

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

Se denominan metales pesados a aquellos metales o metaloides cuya densidad es mayor de $4,5 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ y en concreto, plomo, cobre, níquel, cadmio, platino, cinc, mercurio y arsénico. Estos metales existen en el ambiente de manera natural en cantidades y formas químicas variables dependiendo de circunstancias como son entre otras la localización geográfica, régimen de temperaturas o humedad. Su contenido natural se ha alterado por causas antropogénicas lo que ha influenciado y modificado considerablemente los ciclos naturales y los ecosistemas. Aunque las actividades mineras ya comenzaron a influir 20 siglos antes de nuestra era, la irrupción de metales pesados en el ambiente y la consecuente contaminación comienza con la industrialización y el consumo de energía procedente principalmente de combustibles fósiles.

Todos los metales pesados se transportan por el medio ambiente, atmósfera incluida y para ellos existen ciclos al igual que los que para otros elementos. Dichos ciclos, al igual que ha ocurrido con estos últimos, han sido modificados por el hombre. El ritmo actual de extracción y dispersión masivo de metales, incluidos los pesados, ha incrementado de manera notable su presencia en los diferentes sistemas circulatorios, incluido el atmosférico.

Las emisiones de metales pesados se originan fundamentalmente en grandes instalaciones de combustión, especialmente aquellas que utilizan combustibles sólidos, industria de calcinación y síntesis de minerales metálicos, fundiciones, acerías y otras instalaciones metalúrgicas, industria de producción de cemento y vidrio e instalaciones de incineración de residuos urbanos y sanitarios.

Los metales pesados muestran gran tendencia a formar complejos, especialmente con ligandos del medio biológico conteniendo nitrógeno, azufre y oxígeno, lo cual puede explicar los efectos tóxicos de los metales pesados. No obstante, las consecuencias sobre la salud dependen del estado físico y químico del metal, que puede presentar formas tóxicas y formas inocuas. Además del carácter tóxico de elementos como mercurio o cadmio, otros metales pesados como manganeso, cobre, cinc, cobalto y otros son esenciales para muchos organismos, por lo que su deficiencia puede tener graves repercusiones. Por último, hay que recordar que un mismo elemento a bajos niveles es necesario mientras que puede ser tóxico a mayores concentraciones.

Este carácter tóxico es que ha llevado al establecimiento de normas tanto gubernamentales como institucionales acerca del contenido máximo permitido o recomendado de metales en diferentes matrices como agua, alimentos, plásticos o pinturas.

La determinación de metales pesados en diversos tipos de matrices en un problema clásico de la Química Analítica y la respuesta que se le ha dado en cada época ha dependido del estado de los conocimientos y así podemos citar desde las gravimetrías y volumetrías de la primera mitad del siglo XX, la espectrofotometría y técnicas electroquímicas en tercer cuartil del siglo pasado a las técnicas atómicas y de masas actuales.

Un tipo de procedimientos de gran interés son los ensayos rápidos, los cuales se pueden considerar como una combinación de herramientas analíticas simples, portátiles y baratas con procedimientos de análisis sencillos para la identificación o determinación de sustancias. Son de diverso tipo y entre ellos encontramos desde reacciones en disolución con observación visual o medida instrumental, a volumetrías con cuentagotas, medida de la longitud o radio de zonas coloreadas u otros.

Todos estos sistemas tienen de común el que pueden llevar a cabo fuera de un laboratorio. En ellos, razones de inmediatez, privacidad u oportunidad priman sobre los habituales de un análisis químico, especialmente en términos de exactitud o precisión [1]; [2].

Uno de estos sistemas rápidos son las llamadas tiras reactivas, sensores de un solo uso o sensores desechables, que se podrían definir como dispositivos analíticos autocontenidos que pueden ser utilizados, o no, en conjunción con instrumentación portátil. De forma más precisa, podríamos decir que son formulaciones analíticas en las que todos los reactivos necesarios para hacer un análisis se encuentran presentes en estado sólido sobre o dentro de adsorbentes o películas dispuestas sobre láminas de material plástico [3]. Estas zonas reactivas o matrices se encuentran adheridas a pequeñas tiras de material plástico que permiten su manipulación. Las matrices pueden ser papeles impregnados con reactivos, películas poliméricas conteniendo los reactivos o capas especiales con los citados reactivos. En este caso, para efectuar la prueba analítica, el sensor -tira reactiva- se pone en contacto con la disolución a analizar, bien por inmersión o bien depositando un volumen pequeño y conocido de la misma sobre la zona activa del sensor. Al difundir el problema en la zona de reacción, disuelve los reactivos y provoca la reacción o, lo que es muy habitual, desencadena

un conjunto de reacciones que originan el desarrollo de una propiedad analítica que permite la estimación de la cantidad de analito presente. Dicha estimación se puede llevar a cabo visualmente usando una carta de colores, estimación semicuantitativa, o mediante un pequeño instrumento especialmente diseñado para ello y con el que se mide alguna propiedad óptica o eléctrica sobre el propio dispositivo, bien en equilibrio o de forma cinética.

Las tiras reactivas tratan de satisfacer las necesidades de información química, o, más precisamente, de información que se pueda obtener mediante el análisis químico, a niveles próximos al gran público. Por tanto, deben de cumplir una serie de condiciones como son: ausencia de manipulación de reactivos y disolventes, sencillez de uso, robustez, facilidad de lectura de resultados, inmediatez, bajo costo, y que no sea necesario personal cualificado para su uso.

De alguna manera supone una democratización – si fuera posible aplicar ese concepto- de la Química Analítica. No es necesario saber, no es necesario esperar, no es necesario recurrir a un especialista. En la intimidad de su casa una mujer puede saber si está embarazada, si el contenido en cloro o amonio cuaternario de su piscina está al nivel adecuado o si su nivel de glucosa en sangre es normal. Incluso se usan para cuestiones más polémicas como podría ser el control paterno del consumo de drogas de abuso en jóvenes o del patrón sobre sus empleados.

Pero además de estas necesidades de información en casa o a pie de cama por parte de usuarios no cualificados, hay muchas otras que pueden ser cubiertas por este tipo de dispositivos. Este es el caso de laboratorios de rutina de análisis clínicos o investigaciones de campo por parte de geólogos, policía científica o servicios de vigilancia ambiental con diversos objetivos. Así, determinar de forma rápida valores de parámetros clínicos en orina y sangre, la denominada en este ámbito Química Seca y que cambia el concepto de laboratorio clínico al permitir utilizar el análisis rutinario de orina como discriminante del estado de salud de poblaciones mayoritariamente sanas. También se pueden usar en procedimientos de muestreo para seleccionar qué muestras tomar, para monitorizar valores límite en control de procesos, para determinar componentes lábiles, por ejemplo en aguas naturales, mediante análisis *in situ*, o para estimación de niveles de analitos que permitan establecer una estrategia de análi-

sis. Incluso para cuestiones tan aparentemente nimias como la verificación de muestras, así cuando se sospecha una confusión de las mismas.

El concepto de tira reactiva encaja en la cultura del usar y tirar tan extendida hoy en día y que aparece en USA a partir de la II Guerra Mundial por el desarrollo tecnológico que caracteriza la reconstrucción bélica.

Hay una acelerada producción de bienes de consumo y se generaliza la propaganda y venta de productos de usar y tirar, mercancías de un solo empleo, que van desde manteles a maquinillas de afeitarse, envases no retornables o compresas higiénicas. La brevedad –valor de lo efímero- se convierte en el motor que retroalimenta el sistema. Todo producto lleva en sí o potencia su propia muerte.

En este contexto, el desarrollo de dispositivos analíticos que no exigen el uso de un laboratorio, que no emplean en absoluto, o casi, reactivos en disolución, que no necesitan personal con conocimientos, que se pueden usar en cualquier sitio, que responden de forma prácticamente inmediata y que casi no generan residuos, es, evidentemente, bien acogido y aparece como un producto –¡no olvidemos que antes el análisis era un servicio!- que encaja en los hábitos culturales.

Estas tiras reactivas se pueden clasificar en dos formatos diferentes, las basadas en observación visual y las que realizan medida instrumental.

Las primeras son herederas de la tradición en Química Analítica de los papeles reactivos, el más conocido de los cuales es el papel de pH en sus diversas variantes (tornasol/universal/décimas). Estas tiras pretenden clasificar a la muestra atendiendo a un parámetro de interés en algún subgrupo de concentraciones mediante comparación visual a través de diversos procedimientos; originando un color o una modificación de un color previo. Los resultados son meramente cualitativos o como mucho permiten una estimación semicuantitativa mediante el uso de cartas de colores. De esta manera se obtiene una información que se suele denominar semicuantitativa, con un grado de exactitud baja [4], basada en la capacidad de discriminación entre colores del ojo humano. Así dureza o hierro en agua. Alternativamente, pueden ser de tipo disyuntivo (sí/no) según se supere un determinado valor de concentración, a veces un límite legal. Están diseñados para que sea perceptible por encima de ese nivel, así un test de embarazo.

Sin embargo, aunque actualmente se siguen usando estos ensayos, los inconvenientes que presentan se fueron eliminando mediante la introducción de nuevas tecnologías y un cuidadoso control de la fabricación y el uso de medidas cuantitativas mediante instrumentación eléctrica u óptica. En esta Memoria de Doctorado solo se tratará de tiras reactivas de tipo cuantitativo a través de medidas ópticas.

Este tipo de sistema analítico fue usado extensamente a partir de finales de la década de los 70 y en la de los 80 en análisis clínicos -la llamada, en general, *Dry Reagent Chemistries* [5] y denominada en España Química Seca-.

Las tiras basadas en una medida instrumental utilizan una medida cuantitativa que suministra una información más fiable y precisa que la simple distribución en categorías. Las medidas más utilizadas, aunque no las únicas, son las eléctricas y las ópticas. Dentro de las eléctricas, las tiras desechables amperométricas son las de mayor uso, aunque otras, como las potenciométricas, son de interés. En tiras reactivas ópticas, las más usadas son las que se basan en medidas de reflectancia difusa aunque también en espectrofotometría, fluorescencia, tanto directa como usando campo evanescente y, más raramente, en otras como quimioluminiscencia.

En este tipo de sistemas analíticos, a diferencia de los procedimientos analíticos convencionales, no se trata de poner a punto un procedimiento, sino de preparar el sistema en su conjunto para su uso por el cliente. La dimensión comercial y económica de este tipo de procedimientos rápidos es mayor que en otras técnicas y procedimientos. Y buena prueba de ello, es el habitual empleo aquí de patentes y modelos de utilidad como forma de publicación y protección de resultados.

Es muy frecuente que sean desarrollados directamente por empresas, ya que las propiedades y características que deben mostrar, no solo analíticas sino de estabilidad, robustez mecánica, precio, etc., hacen que sea necesaria una tecnología media/alta para compatibilizar prestaciones y precio. A pesar de todo ello, supone una oportunidad de negocio para muchas empresas por el volumen de potenciales clientes que existen y de hecho en la actualidad es un próspero campo de actividad para muchas empresas como Merck, Macherey-Nagel, Kyoritsu, Hach, LaMotte Company, Industrial Test Systems, etc.

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

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

Entre los procesos de reconocimiento utilizados para metales [6] podemos citar:

1) Propiedades intrínsecas. Utilizadas cuando el analito muestra una propiedad intrínseca útil y se pueden evitar los problemas de interferencia para el problema concreto. El simple contacto de la muestra con el sensor desechable, sin o con etapa previa de preconcentración, hace posible la determinación. Un caso donde se ha usado ha sido la determinación de plomo por análisis potenciométrico con redisolución [7] o la de plata en líquidos de procesado fotográfico por voltametría de redisolución [8].

2) Reacciones de complejación. Se han usado típicamente para metales, aparte de otras aplicaciones, mediante: a) reacción directa con el problema así calcio en fluidos fisiológicos con 3,3'-bis[N,N-di(carboximetil)aminometil]-o-cresolftaleina [9] o níquel con dimetilglioxima [10] o b) por reacción con el agente complejante previa reducción del ion metálico, este es el caso de la tira reactiva visual para vanadato, molibdato y hierro en líquidos de refrigeración con ácido gálico e hidraxilamina [11].

3) Reacciones anfitrión-huésped. Las moléculas anfitrión (ionóforo o *host*) han sido utilizadas para el reconocimiento de iones metálicos, además de para otros usos, en dispositivos de un solo uso basándose en la combinación de la complementariedad de forma con el huésped (*guest*) y en la adecuada organización tanto de posición como estereoquímica de los grupos enlazantes del anfitrión [12]. Se han utilizado en este contexto diferentes tipos de

ionóforos que poseen grupos coordinantes, cadenas alquílicas no polares y agrupaciones cíclicas. Entre ellas se pueden citar éteres corona [13]; [14], coronanos, podanos [15], crip-tandanos [16], antibioticos como valinomicina [17]; [13], tetralactonas, macrólidos actinas tales como monactina, monensina [17], nonactina [18] y diamidas no cíclicas{Capitan-Vallvey, 2004 3526 /id}, entre otros.

Se han usado mediante reacción directa con el analito, que habitualmente son iones alcalinos o alcalinotérreos, y posterior medida potenciométrica. Estas membranas selectivas de iones de un solo uso habitualmente incluyen un aglutinante hidrofóbico inerte o matriz donde se encuentra disperso el ionóforo junto con un plastificante que permita la movilidad de los iones en membrana. Así han sido usados para la determinación directa de potasio [17]; [19]; [18].

Una segunda posibilidad que permite el reconocimiento visual u óptico de cationes consiste en el acoplamiento de un indicador que pone de manifiesto el reconocimiento del analito. En este caso, el sistema funciona por intercambio iónico entre una fase orgánica tridimensional de PVC plastificado y la fase acuosa conteniendo el analito. Se han utilizado diferentes sistemas operativos y organizaciones para incluir las requeridas fases hidrofóbicas e hidrofílicas en fase sólida conteniendo los reactivos: ionóforo, cromoinóforo, plastificante, disolución reguladora y otros. Se han propuesto diversas tiras reactivas de este tipo para determinar iones alcalinos y alcalinotérreos [15]; [13]; [20].

4) Reacciones enzimáticas. El empleo de reacciones catalizadas por enzimas ofrece diversas posibilidades para el desarrollo de tiras reactivas, entre otras para metales. El origen de los enzimas puede ser natural o modificado genéticamente para aumentar su idoneidad para la aplicación. También se han usado materiales celulares (tejidos vegetales, células bacterianas, etc.) como fuente de actividad enzimática.

De entre las diferentes estrategias basadas en enzimas, se han usado algunas para el desarrollo de sensores desechables para iones metálicos, así cuando el analito es cofactor de una reacción enzimática. La determinación del ion metálico es posible a través de la activación del enzima. Este es el caso de un ensayo óptico para cinc usando fosfatasa alcalina y p-nitrofenil fosfato como sustrato [21]. La inhibición enzimática por metales que bloquean el centro activo del enzima ha sido utilizada para el desarrollo de sensores desechables. Este

es el caso de la tira reactiva visual para mercurio basada en la inhibición de la ureasa la cual cataliza la hidrólisis de la urea y modifica el pH del medio puesto de manifiesto por un indicador ácido-base [22].

La integración de reactivos y operaciones analíticas en el sensor desechable depende principalmente del tipo de medida empleado, así como de otros factores tales como la relación entre el problema y el sensor desechable o el tipo de matriz.

Brevemente vamos a comentar en primer lugar los sensores desechables visuales y ópticos y luego los electroquímicos utilizados para iones metálicos. En los sensores desechables visuales, la concentración de analito se mide por la extensión de la reacción en la fase sólida a través de la medida del cambio de color. Esto se hace comparando el color de la tira reaccionada con una carta de colores estandarizada que contiene un número discreto de zonas de color correspondientes a diferentes concentraciones de analito. La correspondencia del color de la tira reaccionada con el de una zona dada o la interpolación entre zonas adyacentes permite estimar la concentración.

Existen diferentes tiras reactivas de este tipo comercializadas para ensayo de metales pesados en aguas potables, aguas de piscina, aguas de baño, suelos, industria y, entre otros, productos educativos. Así podemos citar arsénico (III) y (V), aluminio, cinc, cromo (III), cobre, hierro (II) y (III), plomo, manganeso (II) y (VII), mercurio, molibdato, níquel, paladio y plata, entre otros por diversas empresas entre las que podemos citar Industrial Test Systems, Inc. (Hach Company), LaMotte Company (Thomas Scientific), AquaChek, Omega Engineering Inc., Merck, Gallard-Schlesinger Industries, Inc., Serim Research Co., Macherey-Nagel, Kyoritsu, 3M, Thermo Electron Corporation, Palintest Ltd. y EnviroLogix Inc.

La técnica óptica más utilizada para sensores desechables cuantitativos es la espectrometría de reflectancia difusa, dado que muy frecuentemente que dichos sensores sean opacos [23], pudiendo medirse tanto en la cara por donde se deposita el problema como por la cara opuesta, siendo este último sistema muy habitual en las tiras reactivas multicapa. Otras alternativas utilizadas consisten en: la medida de características cromáticas del sensor [24]; la medida de absorción de radiación por transmisión [25]; [26]; luminiscencia, tanto fluorescencia [27], como fosforescencia [28] o quimioluminiscencia [29]; [30].

Los sensores de un solo uso electroquímicos se pueden considerar como celdas electroquímicas autocontenidas sobre las que se coloca la muestra [31]. Se han usado diferentes propiedades eléctricas en conexión con estos sensores, siendo las más utilizadas la amperometría, potenciometría, técnicas de redisolución y conductimetría

Las técnicas más habituales para la preparación de sensores desechables electroquímicos, por su gran volumen de producción, reproductibilidad y coste, son las técnicas de película gruesa (serigrafía o screen-printing) y las técnicas de película delgada (litografía); siendo la primera de ellas la más usada. No obstante, técnicas como la impresión por chorro (ink-jet printing) [32] y el rotogravado [33] también se han empleado.

Las técnicas de serigrafiado son muy usadas por la facilidad para emplear tintas basadas en polímeros de baja temperatura de curado ($<100^{\circ}\text{C}$). De esta manera, se logra la deposición de films conteniendo reactivos orgánicos en condiciones suaves sobre sustratos plásticos o bien cerámicos, siendo el proceso adecuado para la producción en masa de estos sensores. El material de electrodo más utilizado es el carbón por la gran versatilidad que presenta al poder formularse con diferentes conductores, disolventes y aditivos; mientras que el electrodo de referencia más habitualmente empleado es el de Ag/AgCl preparado a partir de una pasta de plata conteniendo AgCl [34].

Los dispositivos electroquímicos de un solo uso más utilizados para metales pesados son, con mucho, los de redisolución. La combinación de potenciostatos/galvanostatos en conjunción con electrodos desechables serigrafiados y ordenadores portátiles hace posible la determinación cuantitativa de metales pesados.

Entre otros procedimientos podemos citar el SA-1000 Scanning Analyzer para monitorización de plomo y cobre en agua y el SA-5000 Scanning Analyzer para plomo en polvo, aire, agua, pintura y suelos; ambos de la empresa Palintest Ltd [35]. También el HSA-1000 para analizar plomo y cobre mediante voltametría de redisolución anódica de pulso diferencial de la empresa Hach Company [36]. Para la determinación de plomo en sangre total se han comercializado diferentes instrumentos junto con las correspondientes electrodos desechables, así el LeadCare [37] desarrollado conjuntamente por ESA, Inc. y AndCare, Inc. con la ayuda del U.S. Center for Disease Control (CDC) y basado en un electrodo desechable de oro.

Si atendemos a como se relaciona el problema conteniendo el analito con la tira reactiva, se pueden clasificar estos ensayos en dos grupos: sistemas verticales y sistemas horizontales. En los sistemas verticales el fluido atraviesa perpendicularmente la capa o capas que constituyen la zona reactiva sufriendo un conjunto de reacciones y procesos que permitirán desarrollar una propiedad analítica, estos son los mas comunes. En los sistemas horizontales la muestra se deposita sobre una zona de recepción y se mueve por flujo fluido a través de la tira de ensayo produciéndose como consecuencia de esa migración separaciones cromatográficas, reacciones y/o retenciones de analito o interferentes, que originaran la propiedad analítica. En esta Memoria de Doctorado solo trataremos de ensayos de tipo vertical.

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

Los reactivos en los sistemas verticales se encuentran en fase sólida y se pueden distribuir o bien a través de toda la matriz de la tira reactiva o bien pueden estar compartimentalizados en dominios específicos dentro de la infraestructura de la matriz. Esta distribución de reactivos y componentes necesarios se puede lograr de dos maneras: 1) mediante una única capa, los llamados sistemas monocapa; o 2) mediante un conjunto de capas diferenciadas que se encuentran apiladas, los llamados sistemas multicapa. La mayor o menor complejidad del sistema dependerá del propio analito, de la complejidad de la matriz que lo contiene y de la selectividad de la reacción de reconocimiento.

Los sistemas monocapa, a su vez pueden emplean membranas constituidas por una única capa que puede ser homogénea o bien heterogénea. Los sistemas homogéneos son los más simples y consiguen una distribución homogénea de componentes a través de procesos de impregnación de un soporte adsorbente -sistemas de fibra impregnada, por deposición de una disolución de reactivos sobre un soporte no absorbente o bien por fabricación de un film usando un material formador de película junto con los reactivos sobre un soporte plástico. Todo ello se puede lograr por técnicas de inmersión, pintado, rociado, aplicación o deposición.

El empleo de formatos monocapa presenta ventajas en cuanto a su fabricación, sin embargo con ellos no se pueden resolver con eficacia todos los problemas, ni se pueden aplicar a cualquier conjunto de reacciones o procesos. La determinación de algunos compuestos en solución acuosa raramente se puede llevar a cabo con un único reactivo y, consecuentemente, es frecuente usar una combinación de diversos reactivos para reacciones multietapa. Por ello, se han desarrollado los sistemas multicapa, en los que se sitúan un conjunto de capas de diferente naturaleza que serán recorridas verticalmente por la muestra, produciéndose un conjunto secuencial de operaciones analíticas, así disolución, filtración, diálisis o extracción, junto con reacciones químicas de muy diverso tipo, tales como neutralización, complejación, reacciones redox, formación de compuestos insolubles, reacciones estereoespecíficas u otras, y todo ello, integrado en una película de espesor menor de 100 μm .

En los sistemas horizontales, se impone un movimiento lateral a la muestra por flujo fluido lo que hace posible tomar la muestra a la vez que se evita la contaminación cruzada, así como organizar operaciones analíticas secuencialmente y llevar a cabo separaciones cromatográficas de reactivos o interferentes que no se pueden efectuar en los sistemas verticales. Estos dispositivos de flujo lateral, también llamados tiras reactivas inmunocromatográficas, se han usado frecuentemente en sensores inmunológicos heterogéneos en los que se aplica una etapa inmunocromatográfica mediante la inmovilización de anticuerpos y/o oligonucleótidos de posiciones predeterminadas de la membrana, las llamadas zonas de captura. Sin embargo, este tipo de dispositivos se utilizan escasamente para metales pesados, siendo mas habituales los de tipo vertical.

Biogafa

- [1] M. Unger-Heumann, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 354 (1996) 803.
- [2] Yu. Zolotov, *Ann. Chim.*, 87 (1997) 285.
- [3] J.Y. Wang, US 4,618,475, 1986.
- [4] B. Ahlers, A. Choulga, and K. Cammann, US 6,200,444, 13-3-2001.
- [5] B. Walter, *Anal. Chem.*, 55 (1983) 498A.
- [6] I. Oehme, O.S. Wolfbeis, *Mikrochim. Acta*, 126 (1997) 177.
- [7] J. Wang, B. Tian, *Anal. Chem.*, 65 (1993) 1529.
- [8] J.W. Dilleen, S.D. Sprules, B.G.D. Haggett and B.J. Birch, *Analyst*, 123 (1998) 2905.
- [9] K. Arai, M. Koyama, and K. Okinawa, US 4,594,225, 1986.
- [10] Macherey-Nagel, Catalog Test Papers, <https://www.macherey-nagel.com/>, 2004.
- [11] I. Jaunakais and J.K. Jaunakais, US 5,106,581, 1992.
- [12] Spichiger-Keller, U. E. *Chemical Sensors and Biosensors for Medical and Biological Applications*, 1 ed.; Wiley-VCH: Weinheim, 1998.
- [13] P. Vogel, D. Thym, Fritz M., and D. Mosoiu, US 5,211,914, 1993.
- [14] L.F. Capitán-Vallvey, M.D. Fernández-Ramos, P. Alvarez de Cienfuegos and F. Santoyo-Gonzalez, *Anal. Chim. Acta*, 481 (2003) 139.
- [15] M.L. Gantzer, P.R. Hemmes, and D. Wong, US 4,670,218, 1987.
- [16] S.C. Charlton, US 4,734,375, 1988.
- [17] C.J. Battaglia, J.C. Chang, and D.S. Daniel, US 4,214,968, 1980.
- [18] R. Koncki, S. Glab, J. Dziwulska, I. Palchetti and M. Mascini, *Anal. Chim. Acta*, 385 (1999) 451.
- [19] D.P. Hamblen, C.P. Glover, and S.H. Kim, US 4,053,381, 1977.

-
- [20] P. Vogel, D. Thym, Fritz M., and D. Mosoiu, US 5,302,346, 12-4-1994.
- [21] A.M. Zhavoronkova, I.A. Veselova, S.V. Muginova and T.N. Shekhovtsova, *J.Anal.Chem.*, 58 (2003) 77.
- [22] G.-Q. Shi, G. Jiang, *Anal.Sci.*, 18 (2002) 1215.
- [23] R. Phillips, G. McGarraugh, F.A. Jurik, and R.D. Underwood, US 5,563,042, 1996.
- [24] N.I. Ershova, V.M. Ivanov, *Anal.Chim.Acta*, 408 (2000) 151.
- [25] K. Hildebrand, H.H. Von Döhren, H. Perrey, and K. Wehling, US 4,824,640, 1989.
- [26] L.F. Capitán-Vallvey, P. Alvarez de Cienfuegos, M.D. Fernández-Ramos and R. Avidad-Castañeda, *Sensors Act.B*, 71 (2000) 140.
- [27] R.W. Eisinger, M.H. Khalil, D.H. Katz, and R.B. Sargeant, US 4,943,522, 1990.
- [28] L.F. Capitán-Vallvey, O.M.A. Al-Barbarawi, M.D. Fernández-Ramos and R. Avidad-Castañeda, *Talanta*, 60 (2003) 247.
- [29] H. Akhavan-Tafti, K. Sugioka, Y. Sugioka, and L.V. Reddy, US 5,843,666 , 1998.
- [30] J. Ballesta Claver, M.C. Valencia Miron and L.F. Capitán-Vallvey, *Anal.Chim.Acta*, 522 (2004) 267.
- [31] J. Wang, B. Tian, J. Wang, J. Lu, C. Olsen, C. Yarnitzky, K. Olsen, D. Hammerstrom and W. Bennett, *Anal.Chim.Acta*, 385 (1999) 429.
- [32] J.D. Newman, S.F. White, I.E. Tothill and A.P.F. Turner, *Anal.Chem.*, 67 (1995) 4594.
- [33] O. Bagel, E. L'Hostis, G. Lagger, M.D. Osborne, B.J. Seddon, H.H. Girault, D. Brack, U. Loyall and H. Schafer, *J.Electroanal.Chem.*, 469 (1999) 189.
- [34] V.B. Nascimento, L. Angnes, *Quim.Nova*, 21 (1998) 614.

[35] Palintest Ltd, Lead and copper monitoring, http://www.palintest.com/lead_testing.htm, 2004.

[36] Hach, HSA1000 Analyzer for Lead and Copper, <http://www.hach.com/>, 2004.

[37] ESA, LeadCare Childhood Lead Testing, http://www.esainc.com/products/blood_lead/esa_leadcare.html, 2004.

CAPÍTULO 2

BASES FÍSICO-QUÍMICAS

BASES FÍSICO-QUÍMICAS

Este capítulo es una introducción sucinta a las técnicas ópticas usadas en esta Tesis para la realización de las medidas analíticas. También se hace una breve descripción de la forma de realizar las medidas para cada técnica, así como de la forma de preparar las membranas.

1. Técnicas de medida

1.1. Absorción de radiación

Al incidir la radiación electromagnética sobre un cuerpo transparente una parte es reflejada, otra parte es absorbida y una tercera parte saldrá al exterior tras atravesarlo. En este proceso, parte de la energía de la radiación es transferida temporalmente a la molécula y, como consecuencia, disminuye la intensidad de la radiación [1].

Se denomina transmitancia al cociente: $T = \frac{I}{I_0}$, donde I_0 es la intensidad incidente e I la intensidad transmitida. La absorbancia, que será la magnitud analítica utilizada, se define por la ecuación:

$$A = \log \frac{1}{T} = \log \frac{I_0}{I} \quad (2.1)$$

De acuerdo con la ley de Beer, la absorbancia se relaciona linealmente con la concentración de la especie absorbente (c) y con la longitud de la trayectoria (b) de la radiación en el medio absorbente. Es decir:

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot c \quad (2.2)$$

donde ε es la constante de proporcionalidad denominada absorptividad molar que tiene unidades de $L \cdot cm^{-1} \cdot mol^{-1}$. La intensidad de la absorción de una transición electrónica a cualquier longitud de onda, esta determinado por la probabilidad de que ocurra dicha

transición y el tamaño de la molécula o especie absorbente. La absorción máxima de una banda corresponde a la transición mas probable en la región de absorción [2]. La ley de Beer es una ley límite y se aplica cuando la energía radiante absorbida por la especie se pierde en forma de calor y en sistemas homogéneos y continuos como son las disoluciones verdaderas, por lo que existen un gran número de desviaciones tanto reales como aparentes que deberán ser tenidas en cuenta en el empleo de los sensores de un solo uso estudiados en esta Memoria.

1.1.1. Método de medida

La medida de absorción de radiación por parte de las membranas se ha realizado con dos tipos de espectrofotómetros. Por una parte un espectrofotómetro de tipo secuencial, el espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 2 y por otro uno de tipo simultaneo, el espectrofotómetro de diodos en fila HP 8453 ChemStation. Para poder medir las membranas de un solo uso, estas se sitúan una vez tratadas con la disolución problema en un portamuestras adecuado en el compartimento de medida del espectrofotómetro, donde se mide la señal analítica que nos permite cuantificar el analito presente. Se han utilizado dos tipos de portamuestras de diseño propio que permiten

situar la tira reactiva y que se adaptan al compartimento de cubetas de cada uno de los espectrofotómetros aquí empleados. Dichos portamuestras están fabricados en hierro y pintados de negro (Figura 2.1). Cuando la tira reactiva es introducida en uno de ellos, el orificio que presentan coincide con la zona activa del sensor, de forma que el haz de radiación la atraviesa por la zona central. En todos los casos el diámetro del orificio del soporte es ligeramente inferior al de la zona activa de la tira reactiva,

aumentándose así la reproducibilidad de las medidas. De esta manera se evita que la radiación atraviese los bordes del sensor, pues es la zona de la membrana que está sujeta a mayores variaciones en función de cómo haya tenido lugar el secado de la zona activa.

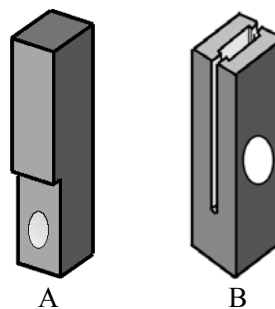


Figura 2.1. Tipos de soportes adaptadores utilizados para diferentes espectrofotómetros (A) HP8453. (B) Perkin Elmer Lambda 2.

1.2. Luminiscencia

La luminiscencia se define como la intensidad de luz emitida por parte de átomos o moléculas excitados electrónicamente. Para producir la excitación electrónica es necesario aportar energía, y en función del tipo de energía aportada se pueden distinguir varios tipos de luminiscencia (electroluminiscencia, quimioluminiscencia, termoluminiscencia y fotoluminiscencia). En el caso de la fotoluminiscencia (fluorescencia y fosforescencia) la excitación se lleva a cabo utilizando una fuente de radiación infrarroja, visible o ultravioleta.

La interacción entre materia y radiación luminiscente puede explicarse siguiendo dos diferentes modelos: uno que considera la radiación luminiscente como una sucesión de ondas y otro que la considera como un conjunto de partículas discretas. Este último es el modelo de Planck, que implica que la energía radiante solo puede ser absorbida en forma de cuantos de energía. La energía de un cuanto vendría definida por la siguiente expresión:

$$E = h \cdot \nu = h \cdot \frac{c}{\lambda} \quad (2.3)$$

en la que ν es la frecuencia, h es la constante de Planck ($6,626 \cdot 10^{-34}$ J·s), λ es la longitud de onda y c es la velocidad de la luz en el vacío ($2,998 \cdot 10^8$ m·s⁻¹).

El conocido diagrama de Jablonski (Figura 2.2) representa la absorción y emisión de radiación luminiscente entre los niveles de energía parcial de una molécula luminiscente típica. De acuerdo con la distribución de Boltzman, a temperatura ambiente los electrones se encuentran en el nivel vibracional más bajo ($\nu=0$) del estado electrónico fundamental. La transición de estos electrones desde el estado fundamental (nivel 0 de S_0) hasta niveles de energía más altos requiere de la absorción de energía luminiscente (a). El principio de Franck-Condon establece que no habrá cambio en la posición nuclear ni en la orientación espín debido a que la absorción de radiación ocurre a velocidades muy altas, requiriendo del orden de 10^{-15} s. Las moléculas excitadas hasta un nivel vibracional superior de cualquier estado excitado pierden el exceso de energía vibracional por colisión con las moléculas de disolvente volviendo así al estado vibracional más bajo. Las moléculas que han alcanzado los estados excitados superiores (S_2, S_3, \dots) se relajan por conversión interna (IC) hasta el estado

excitado singlete más bajo (S_1) sin emitir radiación. La transición desde este nivel (S_1) hasta niveles vibracionales más bajos puede conllevar la emisión de fotones (f).

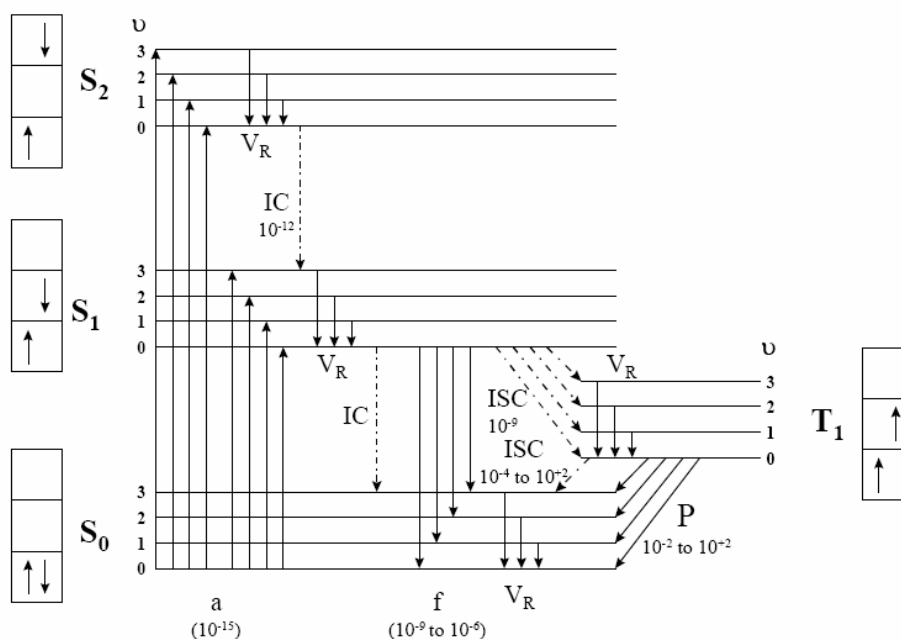


Figura 2.2. Diagrama de Jablonski

Por otro lado, algunas de las moléculas excitadas pueden volver al estado fundamental por medio de otros mecanismos, tales como transferencia electrónica, colisión, cruzamiento entre sistemas (ISC), conversión interna o mediante una reacción química. La emisión de fluorescencia ocurre espontáneamente, estando el tiempo de vida del estado excitado comprendido entre 10^{-9} s (transiciones espín permitidas ($\pi^* \pi$)) y 10^{-6} s (transiciones menos probables ($\pi^* n$)).

Las moléculas que se encuentran en el estado excitado singlete más bajo (S_1) pueden relajarse hasta el primer estado triplete (T_1) mediante cruzamiento entre sistemas (ISC). Este

proceso compite con la fluorescencia, aunque las transiciones entre estados de diferente multiplicidad tienen una baja probabilidad de suceder. La emisión producida por la desactivación desde el primer estado triplete (T_1) hasta el estado fundamental se denomina fosforescencia, y normalmente implica mayores longitudes de onda que la fluorescencia. El tiempo de vida característico de este proceso se encuentra entre los 10^{-2} y 10^2 s.

1.2.1. Tiempo de vida

El tiempo de vida de una determinada especie luminiscente se define como el valor medio de tiempo durante el cual un grupo de moléculas permanece en el estado excitado antes de volver al estado fundamental [3-4]. En el caso de un decaimiento monoexponencial, el tiempo de vida (τ) puede definirse como aquel durante el cual un 1/e (37 %) de las moléculas excitadas inicialmente no se han desactivado todavía (Figura 2.3).

La intensidad de luminiscencia $I(t)$ a un tiempo t se relaciona con el tiempo de vida medio de decaimiento del estado excitado (τ) por medio de la siguiente expresión:

$$I(t) = I_0 \cdot e^{-t/\tau} \quad (2.4)$$

donde I_0 es la intensidad de luminiscencia máxima durante la excitación y t es el tiempo transcurrido después de apagar la fuente de excitación.

1.2.2. Rendimiento cuántico

El rendimiento cuántico Φ_x de una disolución acuosa se calcula aplicando la ecuación (2.5) [5-6], nosotros aplicamos esta misma expresión para el cálculo del rendimiento cuántico de una especie fluorescente en membrana habiendo obtenido buenos resultados. Se utiliza el espectro de emisión corregido porque el fotomultiplicador no es igual de sensible en todo el rango de longitudes de onda.

$$\phi_x = \phi_R \cdot \frac{A_R(\lambda_R)}{A_x(\lambda_x)} \cdot \frac{I(\lambda_R)}{I(\lambda_x)} \cdot \frac{n_x^2}{n_R^2} \cdot \frac{D_x}{D_R} \quad (2.5)$$

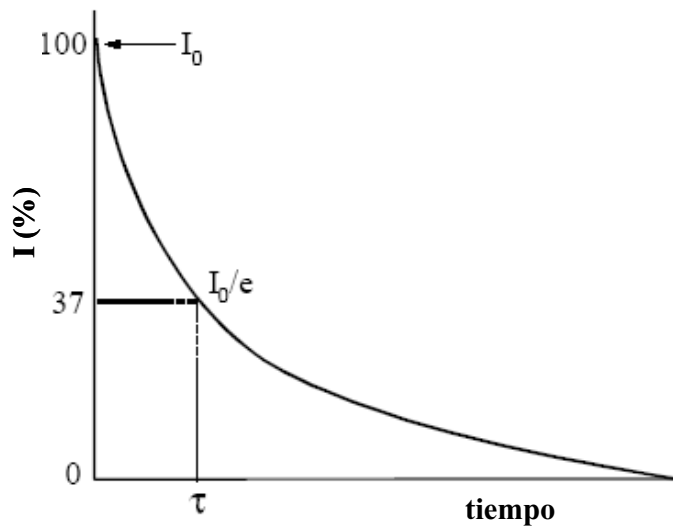


Figura 2.3. Esquema de decaimiento monoexponencial. τ es el tiempo de vida medio de decaimiento del estado excitado.

donde $A(\lambda)$ es la absorbancia de la membrana o bien de la disolución de referencia a la longitud de onda de excitación λ , $I(\lambda)$ es la intensidad relativa de la fuente de excitación a la longitud de onda λ , n es el índice de refracción medio de la membrana y de la disolución de referencia y D es el área integrada bajo el espectro de emisión corregido. Los subíndices x y R hacen referencia a la especie fluorescente en membrana y en disolución (disolución de referencia), respectivamente.

Debido a la similitud existente entre los espectros de emisión de la muestra y de la referencia, no es necesaria la conversión de longitudes de onda a frecuencia para el cálculo del rendimiento cuántico. Tanto la membrana como la disolución de referencia fueron excitadas a la misma longitud de onda. Puesto que el voltaje del detector se mantiene constante durante todas las medidas puede considerarse que $I(\lambda_R) \approx I(\lambda_x)$.

El índice de refracción de la membrana se calcula como promedio de los índices de refracción de los dos componentes principales en la membrana y el índice de refracción de la disolución de referencia es el del disolvente.

Por lo tanto, la ecuación 2.5 podría simplificarse a :

$$\phi_x = 0,21 \cdot \frac{A_R(\lambda_R)}{A_x(\lambda_x)} \cdot \frac{n_x^2}{n_R^2} \cdot \frac{D_x}{D_R} \quad (2.6)$$

1.2.3. Transferencia de energía de resonancia (RET)

La transferencia de energía de resonancia implica un proceso de transferencia de energía desde un donador en estado excitado hasta un aceptor [4,6-8]. El proceso RET supone el acoplamiento de la emisión del donador con la excitación del aceptor y depende de la distancia existente entre donador y aceptor.

La energía de excitación puede transferirse a un fluoróforo vecino mediante un proceso no radiativo siempre que la diferencia entre sus niveles de energía corresponda al cuanto de energía de excitación. En este proceso, cuando el cuanto de energía es transferido, se produce la excitación electrónica del aceptor pasando éste a un estado excitado de mayor energía, simultáneamente el donador vuelve al estado fundamental. Para que tenga lugar este mecanismo es necesario que se de la interacción de resonancia entre donador y aceptor a distancias superiores a las interatómicas. Una de las condiciones necesarias para que el proceso RET tenga lugar es que el espectro de emisión del donador solape con el espectro de absorción del aceptor. También, las orientaciones dipolo de donador y aceptor deben ser aproximadamente paralelas. La probabilidad de que ocurra la transferencia de energía de resonancia es inversamente proporcional a la sexta potencia de la distancia existente entre donador y aceptor (ec. 2.7). Este proceso permite medir distancias en el rango de los 10-100 Å (1-10 nm) y puede detectar cambios incluso en el rango de los 1-2 Å, lo que permite utilizarlo para la medida de cambios conformacionales.

La energía recibida por el aceptor es inferior a la energía cedida por el donador. La diferencia de energía se degrada y se distribuye en el ambiente. El aceptor puede ser una

especie fluorescente o una no-fluorescente. Si el aceptor es una especie fluorescente, la energía transferida será posteriormente emitida por el aceptor. Si el aceptor no es fluorescente, la energía se pierde mediante interacciones con el disolvente.

Cuando donador y aceptor son diferentes, el proceso RET puede detectarse mediante la emisión de luminiscencia por parte del aceptor o mediante la atenuación de luminiscencia del donador. Cuando donador y aceptor son iguales, el proceso RET puede detectarse mediante la despolarización fluorescente resultante. La transferencia de energía de resonancia puede detectarse midiendo la emisión del aceptor fluorescente habiendo sido éste previamente excitado con la energía transferida desde el donador. En general el solapamiento entre la longitud de onda de emisión del donador y la longitud de onda de absorción del aceptor no produciría la emisión luminiscente del aceptor, pero sí se produce si existe transferencia de energía de resonancia. Como comentamos anteriormente, el proceso RET también puede detectarse midiendo el descenso en la intensidad de luminiscencia del donador en presencia del aceptor. El aceptor atenúa la emisión de luminiscencia del donador.

Donador y aceptor no tienen que encontrarse necesariamente formando parte de la misma molécula. El proceso de transferencia de energía puede tener lugar entre moléculas en disolución que se encuentren a una distancia intermolecular de 50-60 Å [9].

1.2.3.1. Cálculo de parámetros RET

La teoría cuantitativa del proceso de transferencia de energía de resonancia fue desarrollada por Förster, y considera que la transferencia de energía tiene lugar gracias a las interacciones dipolo-dipolo entre donador y aceptor [10]. Para obtener información estructural útil de la transferencia de energía de resonancia, la eficiencia del proceso debe relacionarse con la distancia existente entre donador y aceptor. A diferencia de la teoría desarrollada por Dexter para RET, que considera las llamadas transiciones prohibidas, la teoría de Förster solo considera transiciones permitidas [11].

La velocidad del proceso de transferencia de energía depende de varios factores: 1) del grado de solapamiento entre el espectro de emisión del donador y el espectro de absorción del aceptor, 2) de la orientación relativa de los dipolos de transición de donador y aceptor y 3)

de la distancia entre donador y aceptor. Förster desarrolló una expresión para cuantificar la velocidad del proceso de transferencia de energía (K_T), expresada en términos de parámetros accesibles experimentalmente (ec 2.7):

$$K_T = \frac{1}{\tau_D} \cdot \left(\frac{R_0}{r} \right)^6 \quad (2.7)$$

En la que τ_D es el tiempo de vida del donador en ausencia del aceptor, r es la distancia entre donador y aceptor y R_0 es la distancia de Förster, definida como la distancia a la que el proceso RET presenta una eficiencia del 50%. En otras palabras, R_0 es la distancia a la cual el 50% de las moléculas de donador excitadas se desactivan por RET. La magnitud de R_0 depende de las propiedades espectrales del donador y del aceptor y puede calcularse aplicando la ec 2.8, obteniéndose el resultado en nm:

$$R_0 = \frac{0,0211 \cdot \kappa^{1/3} \cdot \Phi_D^{1/6} \cdot J(\lambda)^{1/6}}{n^{2/3}} \quad (2.8)$$

donde k es el factor de orientación, al que normalmente se le da un valor de $\sqrt{2/3}$ para una distribución al azar de moléculas de donador y aceptor, Φ_D es el rendimiento cuántico del donador en ausencia del aceptor, $J(\lambda)$ es la integral de solapamiento que representa el grado de solapamiento entre el espectro de emisión del donador y el espectro de absorción del aceptor (ec 2.9) y n es el índice de refracción del medio.

$$J(\lambda) = \frac{\int_0^{\infty} F_D(\lambda) \cdot \varepsilon_A(\lambda) \cdot \lambda^4 \cdot d\lambda}{\int_0^{\infty} F_D(\lambda) \cdot d\lambda} \quad (2.9)$$

donde $F_D(\lambda)$ es la intensidad de fluorescencia corregida del donador en el intervalo de longitudes de onda donde tiene lugar el solapamiento utilizando el espectro de emisión

normalizado a la unidad y $\varepsilon_A(\lambda)$ es la absorptividad molar del aceptor en el intervalo de longitudes de onda del solapamiento.

A partir de R_0 puede calcularse la concentración crítica de aceptor $[A]_{1/2}$ según la ecuación 2.10 en la que N es el número de Avogadro.

$$R_0 = \left(\frac{3000}{4\pi N [A]_{1/2}} \right)^{1/3} \quad (2.10)$$

La concentración crítica de aceptor se interpreta como la concentración de aceptor necesaria para situar una molécula del mismo a una distancia R_0 del donador.

1.2.4. Atenuación de luminiscencia

La atenuación de luminiscencia puede ser consecuencia de cualquier proceso capaz de disminuir la intensidad de luminiscencia de una determinada especie. Numerosas interacciones moleculares originan atenuación, tales como, reacciones en estado excitado, reorganizaciones moleculares, procesos de transferencia de energía, formación de complejos en estado fundamental y atenuación colisional [4]. La atenuación dinámica o colisional se origina como consecuencia del choque entre las moléculas de la especie luminiscente y de la especie atenuadora, y la atenuación estática se origina como consecuencia de la formación de un complejo no luminiscente entre la especie luminiscente y el atenuador. La atenuación dinámica viene descrita por la siguiente ecuación de Stern-Volmer:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_q \tau_0 [Q] = 1 + K_D [Q] \quad (2.11)$$

En esta ecuación, F_0 y F son las intensidades de luminiscencia del luminóforo en ausencia y en presencia del atenuador, respectivamente, K_q es la constante de atenuación bimolecular, τ_0 es el tiempo de vida del luminóforo en ausencia del atenuador, y $[Q]$ es la concentración del atenuador. La constante de Stern-Volmer viene dada por $K_q \tau_0$. Si el proceso de atenuación es puramente dinámico, la constante de Stern-Volmer será la constante de atenuación dinámica K_D . K_D^{-1} representa la concentración de atenuador a la que

se cumple que la intensidad de luminiscencia del luminóforo ha disminuido al 50% de la intensidad de luminiscencia inicial.

La atenuación estática puede describirse por una función de Stern-Volmer también lineal. Las atenuaciones estática y dinámica se diferencian por su dependencia con la temperatura y la viscosidad, aunque preferiblemente se utilizan las medidas de tiempos de vida para discernir entre ellas. La característica más importante de la atenuación dinámica es que además de producirse disminución en la intensidad de luminiscencia se produce disminución en el tiempo de vida:

$$\frac{F_0}{F} = \frac{\tau_0}{\tau} \quad (2.12)$$

Por lo tanto:

$$\frac{\tau_0}{\tau} = 1 + K_q \tau_0 [Q] = 1 + K_D [Q] \quad (2.13)$$

En el caso de atenuación estática no disminuye el tiempo de vida de la especie luminiscente ya que en la medida de tiempos de vida solo se tienen en cuenta las especies luminiscentes, que en este caso serían las moléculas de luminóforo no complejadas que tendrían el mismo tiempo de vida inicial τ_0 . El complejo formado absorbería energía pero volvería al estado elemental sin emitir energía. En el caso de la atenuación estática la variación en la intensidad de luminiscencia se relaciona con la concentración de atenuador por medio de la siguiente expresión:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_S [Q] \quad (2.14)$$

La dependencia de F_0/F con la $[Q]$ es lineal e idéntica a la observada para la atenuación dinámica con la diferencia de que la constante de atenuación en este caso es la constante de formación del complejo.

La medida de tiempos de vida es la mejor opción para discernir entre atenuación estática y dinámica ya que se cumple que para la atenuación estática $\tau_0/\tau=1$. En muchos casos la atenuación puede ser dinámica y estática a la vez, para esta situación el gráfico de Stern-Volmer presenta una ligera curvatura hacia el eje de ordenadas. Y la variación en la intensidad de fluorescencia con respecto a la concentración de atenuador vendría dada por la siguiente expresión:

$$\frac{F_0}{F} = (1 + K_D[Q])(1 + K_S[Q]) \quad (2.15)$$

Multiplicando los términos entre paréntesis:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + (K_D + K_S)[Q] + K_D K_S [Q]^2 = 1 + K_{app}[Q] \quad (2.16)$$

Donde:

$$K_{app} = \left(\frac{F_0}{F} - 1 \right) \frac{1}{[Q]} = (K_D + K_S) + K_D K_S [Q] \quad (2.17)$$

Representando gráficamente K_{app} frente a $[Q]$ obtendríamos una línea recta de ordenada en el origen K_D+K_S y pendiente $K_D K_S$. Los valores para cada una de las constantes se calculan a partir de la ecuación de segundo grado obtenida. La porción dinámica del proceso de atenuación global podría determinarse por medida de tiempos de vida y basándonos en la expresión $\tau_0/\tau=1+K_D[Q]$ podríamos estimar el valor de K_D .

1.2.5. Métodos de medida

En este apartado tenemos que distinguir los distintos métodos de medida utilizados para medir intensidad de luminiscencia y tiempos de vida en membrana y en disolución.

Para medir la intensidad de luminiscencia y tiempo de vida en membrana se han utilizado dos tipos de espectrofluorímetros. Por una parte el espectrofluorímetro Cary Eclipse de Varian para llevar a cabo las medidas de intensidad de luminiscencia y por otro lado el espectrofluorímetro OB 920 basado en la técnica “time correlated single photon counting” de Edinburgh Instruments provisto de una lámpara de nanosegundos nF 900-HP y de un fotomultiplicador de fotón único S 900 como sistema de detección, para llevar a cabo las medidas de tiempo de vida. Para poder medir las membranas de un solo uso, estas se sitúan en un portamuestras adecuado en el compartimento de medida del espectrofluorímetro, donde se

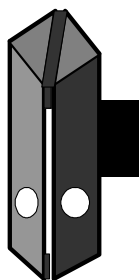


Figura 2.4. Soporte adaptador utilizado para el espectrofluorímetro Cary Eclipse y el espectrofluorímetro OB 920.

mm de espesor donde se introduce la tira reactiva, los orificios están dispuestos de forma que los haces de excitación y emisión formen un ángulo de 45° con el plano del sensor. Cuando la tira reactiva es introducida en el portamuestras, los orificios que presenta coinciden con la zona activa del sensor, de forma que el haz de excitación la atraviesa por la zona central. En todos los casos el diámetro del orificio del soporte es ligeramente inferior al de la zona activa de la tira reactiva, aumentándose así la reproducibilidad de las medidas.

Para medir la intensidad de luminiscencia y tiempo de vida en disolución se ha utilizado un lector de microplacas Tecan Genios Plus, una cámara CCD Imagex-Tgi y el espectrofluorímetro comentado anteriormente OB 920 de Edinburgh Instruments equipado en este caso con una lámpara de microsegundos μF 900-HP. Para llevar a cabo las medidas de intensidad de luminiscencia con el lector de microplacas y con la cámara CCD, las disoluciones se disponían en los diferentes pocillos de una microplaca. Y en el caso de las

mide la señal analítica que nos permite cuantificar o caracterizar el analito presente. Se ha utilizado un portamuestras de diseño propio que permite situar la tira reactiva y que se adapta al compartimento de cubetas de cada uno de los espectrofluorímetros aquí empleados. Dicho portamuestras está fabricado en hierro y pintado de negro (Figura 2.4) y presenta dos orificios ortogonales de 5 mm de diámetro y una apertura diagonal de 1

medidas de tiempo de vida con el espectrofluorímetro OB 920, las disoluciones se disponían en una cubeta de cuarzo que se introducía en el compartimento de cubetas de dicho fluorímetro.

2. Método de preparación de los sensores de un solo uso

2.1. Características físicas

Las características físicas de los sensores de un solo uso desarrollados en esta Memoria de Doctorado son comunes para los distintos modelos propuestos, por ello en este apartado se van describir los sensores así como la metodología utilizada para el desarrollo de los mismos y su posterior uso. Del mismo modo, se indicarán cuales son las principales variables a la hora de su construcción que influyen notablemente en su comportamiento.

Los sensores de un solo uso propuestos para la determinación de iones metálicos en disoluciones acuosas, están constituidos por una lámina transparente de poliéster cuyas dimensiones son 40 mm de largo por 14 mm de ancho y 0,25 mm de espesor.

En una de las caras de la lámina (véase la Figura 2.5) se encuentra la zona activa del sensor, que es la encargada de reconocer al analito y originar una respuesta analítica reproducible susceptible de ser medida. En los sensores construidos y estudiados en esta Memoria de Doctorado, la zona activa es transparente y de color variable, dependiendo del sensor, y las señales analíticas empleadas han sido, la absorbancia medida por transmisión a una determinada longitud de onda, la intensidad de fluorescencia y el tiempo de vida medidos por transmisión a la longitud de onda de emisión máxima.

2.1.1. Preparación de los sensores.

De las diversas metodologías descritas para la preparación de sensores en general y de tiras reactivas en particular, se ha elegido por la sencillez de preparación y los buenos resultados que proporciona, la de disolución de los componentes reactivos junto con los que

originan membrana, en un disolvente que por evaporación controlada, origina una membrana con las características deseadas.

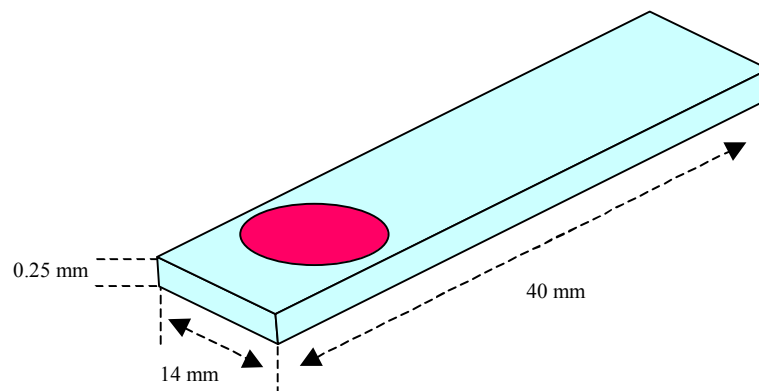


Figura 2.5. Tira reactiva

Para la preparación de los sensores hay que distinguir claramente dos etapas, como son la preparación y optimización de la disolución que contiene los reactivos, a la que habitualmente llamaremos cóctel, y la posterior preparación del sensor propiamente dicha, utilizando el cóctel anterior.

La primera de las etapas será abordada específicamente en los capítulos próximos para cada uno de los sensores desarrollados, aquí solo diremos que en todos los casos se trata de una disolución de un número determinado de componentes en un disolvente orgánico muy volátil; sin embargo, la optimización de concentraciones y proporciones del cóctel requiere estrategias muy diferentes según las características del sensor. De modo que ahora nos centraremos en la preparación del sensor a partir del cóctel.

La preparación de los sensores de un solo uso se realizó mediante un sistema rotatorio de velocidad de giro variable[12]. Este dispositivo (Figura 2.6) consta de un motor que hace girar un plato con una muesca superficial que tiene las mismas dimensiones que la tira

reactiva y es donde se encaja la lámina de poliéster. Todo este mecanismo va cerrado con una tapa superior metálica que presenta un orificio en el que encaja una pieza de teflón expresamente realizada de forma que una vez cerrada dicha tapa queda a una altura y posición adecuadas, para que con ayuda de una micropipeta se puedan depositar un cierto volumen del cóctel en la lámina de poliéster que se encuentra girando a una velocidad dada. De esta forma, el volumen de cóctel depositado se expandirá de forma homogénea sobre el poliéster debido a la acción de la fuerza centrífuga. A continuación, se deja reposar la lámina en un recipiente cerrado conteniendo el mismo disolvente. Una vez evaporado el disolvente del cóctel, nos resulta una zona circular sobre la lámina donde se encuentran los componentes necesarios para reconocer al analito y producir la señal analítica, y es a esa zona lo que denominamos la zona activa del sensor o zona sensora.

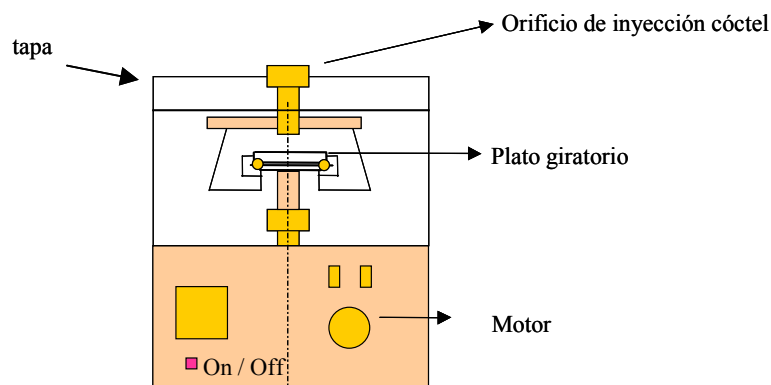


Figura 2.6. Sistema centrífugo de preparación de membranas

Para calcular el espesor de la zona activa, se la ha considerado como un cilindro, por lo que aplicando la ecuación 2.18 podemos calcular la altura de dicho cilindro, es decir, el espesor de la membrana:

$$V = \pi \cdot r^2 \cdot h \quad (2.18)$$

donde r es el radio de la zona sensora, h es el espesor y V es el volumen que ocupan todos los componentes de esa zona. Teniendo en cuenta que el componente mayoritario ($\approx 70\%$) de la zona activa es el plastificante y este es un líquido de densidad conocida se puede aproximar la densidad de la zona activa a la densidad de dicho componente. Por lo que el volumen lo podemos calcular considerando que m es la masa de cada uno de los componentes de la zona sensora y d es la densidad de la membrana:

$$V = \sum \frac{m}{d} \quad (2.19)$$

Bibliografía

- [1] D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, *Analytical Chemistry*.
- [2] F. Pino Perez, D. Perez-Bendito, *Análisis de elementos-traza por espectrofotometría de absorción molecular ultravioleta-visible*, Publicaciones del Monte de Piedad y Caja de Ahorros de Cordoba y Universidad de Sevilla, Cordoba, 1983.
- [3] E. A. H. Hall, Photometric assay techniques, in *Biosensors*, Open University Press, Buckingham, 141-219 (1990).
- [4] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer, 1999.
- [5] J. N. Demas, G. A. Crosby, *J. Phys. Chem.* 75, 991-1024 (1971).
- [6] E. L. Wehry, L. B. Rogers, Fluorescence quenching and energy transfer in organic compounds, in *Fluorescence and Phosphorescence Analysis*, Interscience Publishers, New York, 100-113 (1966).
- [7] M. Völker, H. U. Siegmund. Förster energy transfer in ultrathin polymer layers as a basis for biosensors, in *Frontiers in Biosensorics I*, Birkhäuser Verlag, Basel, 175-191 (1997).
- [8] R. C. Powell, G. Blasse, *Structure and Bonding* 42, 43-93 (1980).
- [9] E. F. Ullman, M. Schwarzberg, K. E. Rubenstein, *J. Biol. Chem.* 251, 4172 (1976).
- [10] T. Förster, *Ann. Phys.*, 2, 55 (1948).
- [11] D. L. Dexter, *J. Chem. Physics*, 21, 836 (1953).
- [12] K. Seiler, W. Simon, *Anal. Chim. Acta*, 73, 266 (1992).

CAPÍTULO 3
DETERMINACIÓN DE COBRE EN
PLASMA MEDIANTE UN SENSOR
ÓPTICO DE UN SOLO USO

DETERMINACIÓN DE COBRE EN PLASMA MEDIANTE UN SENSOR ÓPTICO DE UN SOLO USO

Resumen

En este capítulo se propone un nuevo procedimiento para la determinación de cobre en plasma basado en el desarrollo de una tira reactiva irreversible de un solo uso. La zona sensora de la tira reactiva está formada por dos capas: una capa sensible a cobre y otra capa de diálisis. Consta de una lámina de poliéster conteniendo en un área circular de 10 mm de diámetro y 16 μm de espesor todos los reactivos necesarios para producir una respuesta rápida y selectiva a cobre. Este área, denominada zona activa o zona sensora, está constituida por Nafion como polímero formador de membrana, batocuproina (BC), como agente cromogénico y p-anisidina como agente reductor. Para determinar cobre en plasma es necesario depositar otra capa externa formada por el hidrogel D-6 cuya misión es eliminar las interferencias producidas por las proteínas. Cuando el sensor se introduce en una muestra problema durante 60 minutos, la zona sensora se pone de color naranja y la absorbancia medida a 475 nm puede utilizarse como señal analítica. La tira reactiva responde linealmente en el rango de concentraciones que va desde 0,05 a 1,00 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Su reproducibilidad calculada para una concentración de 3,0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en cobre es del 7,8%. El procedimiento fue aplicado a diferentes muestras de plasma y los resultados obtenidos se contrastaron con el método Boehringer Mannheim como referencia. El método aquí propuesto es sencillo, barato, selectivo y sensible.

1. Introducción

Una de las tendencias actuales en Química Analítica es el desarrollo de metodología analítica que pueda ser usada donde se precise por parte del usuario o cliente, sin necesidad de una cuidadosa toma de muestra, conservación, transporte y ejecución del análisis en el laboratorio analítico por parte de personal entrenado.

El uso de métodos rápidos de análisis [1] permite llevar a cabo los análisis químicos de forma rápida, simple y económica y sin necesidad de personal especializado, toma y tratamiento de muestras y desplazamiento de las mismas hasta los laboratorios convencionales de análisis y uso de instrumentación de laboratorio mas o menos sofisticada [2].

Estos ensayos rápidos se basan habitualmente en el empleo de reacciones (químicas, bioquímicas o inmunológicas) y procesos en condiciones tales que den lugar a un efecto observable visualmente (color desarrollado, longitud de una zona coloreada, número de elementos reaccionados) o fácilmente medible (colorimetría, fotometría, reflectometría, fluorescencia, volumetría, etc.).

De los diferentes ensayos rápidos de análisis, aquellos que utilizan una matriz sólida como soporte (celulosa, polímeros sintéticos, vidrio, materiales cerámicos, etc) son los más interesantes desde el punto de vista práctico (tiras reactivas, papeles reactivos, sensores de gota plana o sensores de un solo uso). En ellos, los reactivos son inmovilizados en la superficie o en el seno del soporte sólido por medio de procedimientos físicos (evaporación, adsorción, etc) o procedimientos químicos (enlace covalente). La señal analítica se desarrolla cuando el sensor -tira reactiva- se pone en contacto con la disolución a analizar. Existen un gran número de ensayos rápidos, algunos de los cuales están disponibles comercialmente, para la determinación de compuestos de interés analítico o clínico (Dry Reagent Chemistries [3]), tales como glucosa, proteínas, enzimas o metales [4-7] entre otros.

El análisis de la cantidad total de iones metálicos presentes en una muestra de tipo biológico conlleva dos grandes problemas: en primer lugar, la baja concentración de los mismos en la muestra y su distribución en forma de distintas especies, y en segundo lugar las posibles interferencias debidas al resto de iones metálicos presentes en la muestra.

El uso de reactivos cromogénicos convencionales puede ser una buena alternativa a la hora de preparar tiras reactivas o sensores de gota plana. Sin embargo, su uso no es muy adecuado para sensores de flujo porque es frecuente que den lugar a reacciones irreversibles debido a las altas constantes de estabilidad de los complejos que forman. Sin embargo, cuando se usan en formato tira reactiva, dado que estos reactivos provocan una gran variación en la energía libre del sistema en reacción y desplazan el equilibrio, se produce un efecto de preconcentración que proporcionará la sensibilidad necesaria para la determinación del analito en muestras poco concentradas.

El problema de las interferencias se podría resolver mediante un diseño multicapa de la tira reactiva de manera que permitiera llevar a cabo distintos procesos analíticos tales como exclusión por tamaño, exclusión por carga, polaridad [8]. Además existen distintos tipos de capas que se pueden estructurar de manera diferente en cada caso. Las más habituales son las siguientes: capa reflectante, capa opacificante, capa distribuidora, capa de reactivos, capa de reactivos inestables, capa de recepción, capa de eliminación de interferencias y capa de separación [9].

La mayoría de las tiras reactivas comercializadas se basan en la medida de reflectancia difusa sobre una zona opaca en la que se encuentran los diferentes reactivos en películas delgadas, matrices celulósicas u otros materiales sintéticos dispuestos sobre un sustrato opaco [10-12]. Por otro lado, se han intentado preparar tiras reactivas transparentes que fueran capaces de absorber líquidos a partir de polímeros formadores de membrana y de componentes que se hinchan con el agua [13]. Sin embargo, en los sensores ópticos es posible depositar una membrana sobre un soporte transparente [14].

En nuestro caso hemos utilizado la metodología de sensores [15] para desarrollar una tira reactiva desechable y transparente. En trabajos previos, nuestro grupo de investigación ha desarrollado una serie de métodos cuantitativos basados en el uso de tiras reactivas para la determinación de cinc [16], hierro [17], calcio [18], nitrito [19], ácido nalixídico [20] o el pesticida morestan [21].

En este capítulo hemos desarrollado una tira reactiva multicapa transparente para la determinación de la cantidad total de cobre en plasma. El cobre es un elemento necesario para el funcionamiento normal del cuerpo humano, estando presente en plasma en un rango

de concentraciones que va desde 1,0 a 1,5 mg·L⁻¹ [22]. Si la concentración supera los 1,5 mg·L⁻¹ empezaría a ser tóxico y por encima de 5,4 mg·L⁻¹ puede provocar daños renales irreversibles, intestinales y hepáticos que pueden producir la muerte si la cantidad ingerida supera 1,0 g [23]. Por lo tanto, es importante desarrollar métodos analíticos rápidos y selectivos para la determinación de cobre en plasma.

El sensor responde a la concentración total de cobre ((I) y (II)) en la muestra. Se trata de una tira reactiva óptica de un solo uso que trabaja en modo discontinuo y que está formada por una lámina de poliéster con una zona sensora que va a contener todos los reactivos necesarios para responder selectivamente a cobre cambiando su color.

Para el desarrollo de la tira reactiva se ha utilizado el reactivo cromogénico convencional batocuproína, que es más selectivo que otros reactivos para cobre [24,25]. Este reactivo forma un complejo catiónico con el ión Cu (I) en un rango de pH que va desde 4 a 8, y puede extraerse con alcoholes pentílicos o n-hexanol (absorptividad molar en alcohol isoamílico 1,42·10⁴ L·mol⁻¹·cm⁻¹ y 1,39·10⁴ L·mol⁻¹·cm⁻¹ en agua [26]).

El procedimiento que utiliza la tira reactiva propuesta se basa en la medida de absorbancia sobre la propia tira tras haber tenido lugar las siguientes reacciones: 1) reducción del ión Cu (II) mediante p-anisidina presente en membrana y 2) complejación del Cu(I) originado mediante batocuproína. Se estudian la influencia de las diferentes variables experimentales que podían influir en la respuesta y las interferencias debidas a las proteínas presentes en el plasma se eliminaron mediante el uso de una membrana de diálisis situada sobre la membrana sensible a cobre. El método propuesto para la determinación de cobre en plasma es rápido, barato, selectivo y sensible y utiliza instrumentación convencional.

Como precedente, podemos citar el método propuesto por T. Saito [27] para la determinación de Cu (II) mediante el uso de una membrana de PVC que contiene a la batocuproína y al plastificante NPOE, pero que necesita adicionar previamente disolución de sulfato de hidroxilamonio como reductor y picrato como contraión, a la disolución que contiene el analito. La batocuproína inmovilizada en el polímero Nafion se ha utilizado para desarrollar una tira reactiva para la determinación semicuantitativa de Cu (I) en aguas de mar [28] y también para la determinación de Cu (I) utilizando un sensor de flujo que contiene batocuproína inmovilizada en una membrana de Nafion [29].

2. Experimental

2.1. Instrumentación y software

Para llevar a cabo las medidas de absorbancia se utilizó un espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda-2 (Nortwalk, CT, USA) conectado a un ordenador IBM SX-486. La recogida y tratamiento de los espectros UV-Vis fue llevada a cabo con el PECSS Software proporcionado por Perkin-Elmer. Las medidas de absorbancia se realizaron utilizando el soporte de la Figura 3.1 anteriormente descrito en el capítulo de Bases fisicoquímicas. Este soporte está construido en un bloque de hierro pintado de negro y presenta un orificio de 4 mm de diámetro que delimita la superficie del haz de luz y evita las posibles refracciones en el borde de la zona sensora.

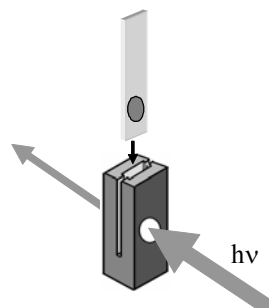


Figura 3.1. Soporte utilizado para medir la absorbancia de la tira reactiva.

Otros aparatos y material de laboratorio utilizados fueron: un sistema rotatorio de velocidad de giro variable[30], comentado anteriormente en el capítulo segundo de esta Memoria de Doctorado, un pH-metro digital provisto de electrodo combinado de vidrio y cloruro de plata (Crison, Barcelona, España). El programa utilizado para el tratamiento estadístico de los datos fue: Statgraphics Versión 6.0, STSC. Inc., de Statistical Graphics Corp., USA, 1993.

2.2. Reactivos y materiales

La disolución madre de cobre ($1.000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) se preparó por pesada exacta de nitrato de cobre trihidratado, disuelto en la mínima cantidad de ácido nítrico concentrado y posterior dilución con agua. Las disoluciones más diluidas se prepararon a partir de la disolución madre de cobre por dilución con agua. Los reactivos batocuproina (2,9-dimetil-4,7-difenil-1,10-fenantrolina); Nafion 5% p/p disuelto en una mezcla de alcoholes alifáticos; p-anisidina, y etanol absoluto fueron proporcionados por Sigma (Sigma Aldrich Química S. A, Madrid). Como soporte sólido de las membranas sensoras se utilizaron láminas de poliéster tipo Mylar (Goodfellow, Cambridge, UK). El hidrogel D-6 se compró a la casa comercial Tyndall-Plains-Hunter Ltd (Ringo, New Jersey, USA). También se utilizaron disoluciones estándar de Fe (III), Sr (II) y Ba (II) como nitratos, Mg (II) y Zn (II) como cloruros, SO_4^{2-} , ClO_4^- , HCO_3^- y Cl^- como sales sódicas y NO_3^- como sal potásica, todas ellas proporcionados por Merck. Todos los reactivos utilizados eran de grado analítico y el agua utilizada procedía de un equipo de ósmosis inversa (Milli-Ro 12 acoplado a un equipo Milli Q de Millipore Co. (Bedford, MA, USA).

2.3. Preparación de la membrana

Como ya comentamos anteriormente, la membrana sensora está formada por dos capas: una capa interna sensible a cobre y otra externa de diálisis. Las disoluciones empleadas para la fabricación de las capas del sensor desechable fueron preparadas de la siguiente forma: a) Para la capa interna sensible a cobre se pesan 2,00 mg (8,2 % p/p) de batocuproina y 0,60 mg (2,5 % p/p) de p-anisidina en un vial de vidrio y se disuelven todos los componentes en 0,5 mL de Nafion (89,4 % p/p). b) Para la capa externa de diálisis se pesan 0,214 g de hidrogel D6 que se disuelven en 4 mL de una mezcla etanol:agua (9:1). Mediante un sistema centrífugo [30] y una micropipeta, se depositan 20 μL de la primera disolución sobre una lámina de poliéster de dimensiones 14 mm x 40 mm x 0,5 mm. Después de treinta segundos, se detiene la rotación y se deja la membrana en un recipiente herméticamente cerrado en presencia de una atmósfera saturada de los vapores del disolvente durante tres minutos a temperatura ambiente. Una vez seca esta capa, se depositan 20 μL de la segunda disolución sobre la primera capa. Después de treinta segundos, se detiene la

rotación y se deja la membrana en un recipiente herméticamente cerrado hasta su completo secado. Las características físicas del sensor obtenido eran las siguientes: película circular sólida y homogénea, transparente e incolora, bien adherida al soporte sólido y con unas dimensiones de 10 mm de diámetro y aproximadamente 15 μm de espesor la capa interna y 1 μm la capa externa.

2.4. Medida de la absorbancia

El parámetro analítico utilizado fue la medida de la absorbancia de la tira reactiva a la longitud de onda de 475 nm frente a un blanco, que era una membrana que había sido equilibrada con todos los reactivos excepto con cobre. Las medidas de absorbancia se realizan usando el soporte anteriormente descrito, con el que se mejora la reproducibilidad de las mismas, ya que al medir en una zona de diámetro constante (4 mm) e inferior al diámetro de la zona activa del sensor, se evitan las irregularidades producidas en los bordes de la zona sensora como consecuencia del secado.

2.5. Procedimiento propuesto para muestras y patrones

Se coloca una alícuota de una disolución patrón conteniendo entre 0,05 y 1,00 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de cobre en una matraz de 50 mL y se le añaden 0,25 mL de una disolución reguladora 1 M de ácido acético/acetato sódico de pH 4,5. En el caso de las muestras se toma 1 mL de plasma sanguíneo y se diluye hasta 50 mL de la misma forma que en las disoluciones patrón. Posteriormente se pone la disolución en una botella de 100 mL conteniendo la tira reactiva y se agita durante 60 minutos en el agitador vibratorio a temperatura ambiente. A continuación, la membrana se saca de la disolución y se sacude para eliminar las gotas de disolución que la puedan mojar; tras lo cual se mide la absorbancia a 475 nm en la forma anteriormente descrita. Todas las medidas se realizan a temperatura ambiente y no es necesario acondicionar las membranas antes de su uso.

3. Resultados y discusión

Parámetros experimentales

Los parámetros que influyen en la respuesta de la tira reactiva pueden clasificarse en dos grupos: a) Parámetros relacionados con la composición de la membrana (naturaleza y proporción de los componentes del cóctel, volumen de cóctel y condiciones de preparación de la membrana), b) Parámetros relacionados con el proceso de equilibración entre la muestra y la membrana (pH, fuerza iónica y tiempo de contacto).

3.1. Composición de la membrana

El primer aspecto considerado en la preparación de la tira reactiva fue la selección de los reactivos más adecuados para la construcción de las dos capas de la membrana sensora. La primera capa debía contener un reactivo capaz de reducir los iones Cu (II) a Cu (I), un reactivo cromogénico capaz de complejar al Cu(I) originado y una matriz polimérica capaz de retener al complejo de cobre formado. La segunda capa debía contener un componente capaz de retener las proteínas presentes en el plasma y que podrían interferir en la formación del complejo de cobre.

Como reactivo cromogénico se ensayaron diversos reactivos que a priori mostraban buenas características para cobre, en concreto ditizona (difentiotiocarbazona), cuprizona (bis ciclohexanonadioxaldihidrazona), 2,2'-biquinolina, neocuproina (2,9-dimetil-1,10-fenantrolina) y batocuproina (2,9-dimetil-4,7-difenil-1,10-fenantrolina, seleccionándose batocuproina (BC) por sus buenas características en membrana (estabilidad, intensidad de color, velocidad de formación, blancos de membrana). La batocuproina forma un complejo altamente coloreado con cobre que posee una gran reactividad, sensibilidad y selectividad hacia este ión [26]. Como el cobre en el complejo es univalente y su estequiometría es 1:2, $[\text{CuL}_2]^+$, su extracción como complejo cargado positivamente en la membrana requerirá la presencia en ella de aniones lipofílicos discretos, o bien, el uso de un polímero cargado negativamente que retenga el complejo como par iónico. La primera estrategia, uso de aniones lipofílicos, no dio buenos resultados porque los componentes de la membrana tenían tendencia a lixiviar a la disolución, lo que se traducía en una baja reproducibilidad. Así que

finalmente se optó por la segunda estrategia y se seleccionó un polímero formador de membrana cargado negativamente como es el Nafion [31].

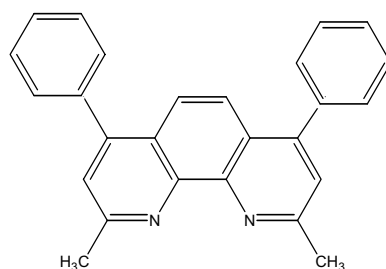


Figura 3.2. Estructura de la batocuproina

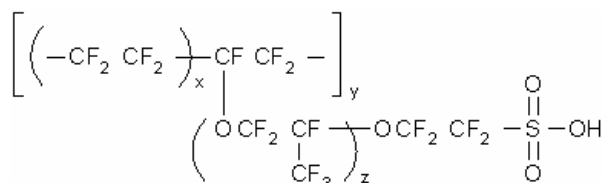


Figura 3.3. Estructura del Nafion

Puesto que el estado de oxidación del cobre en el complejo es univalente y en el plasma se encuentra como Cu (II) formando diferentes tipos de compuestos: ceruloplasmina, transcupreina, albúmina, citocromo C oxidasa, lisil oxidasa, Cu-Zn dismutasa [32], se hace necesario reducir el cobre (II) antes de formar el complejo. Para llevar a cabo esta reducción ensayamos la incorporación de diversos reductores en membrana, tales como p-anisidina, ácido ascórbico, sulfato hidracinio, glutatión, glucosa, sacarosa, metol y ácido úrico. De todos ellos, la p-anisidina fue el único capaz de ser incorporado en la membrana y de reducir al Cu (II) en nuestras condiciones experimentales.

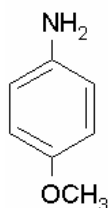


Figura 3.4. Estructura de la p-anisidina

Para la preparación de la segunda capa de diálisis se seleccionó el hidrogel D-6 tras probar otros polímeros tales como polivinilacetato, chitosan, acetato de celulosa e hidrogel D-4, porque era el que mejores resultados ofrecía en la eliminación de las interferencias producidas por las proteínas.

Para optimizar la proporción de los componentes de la membrana interna (BC, p-anisidina y Nafion) se prepararon diferentes sensores en los que se varió la cantidad de los distintos componentes excepto la de Nafion, que se mantuvo constante. De este último se emplearon en todos los casos 0,5 mL, ya que se comprobó que la cantidad de polímero no influía en el desarrollo de la señal analítica. Además de que si queríamos que la tira reactiva fuese viable desde el punto de vista comercial, era preciso utilizar la mínima cantidad de Nafion para disolver en él al resto de los componentes, ya que dicho polímero es el que presenta un coste de adquisición más elevado y encarece el precio final del sensor. Se prepararon diferentes cócteles o disoluciones conteniendo cantidades de p-anisidina entre 0,5 y 5,0 mg, y cantidades de BC entre 1,0 y 4,0 mg. Se observó que cuando la cantidad de BC en el cóctel era superior a 2,5 mg y/o la cantidad de p-anisidina era superior a 3,0 mg, la membrana sensora preparada se volvía opaca al secarse y no servía para su uso como tira reactiva. Las membranas preparadas con los diferentes cócteles preparados fueron ensayadas frente a disoluciones patrón con $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Cu (II), y según puede observarse en la figura 3.5 se obtienen las señales máximas utilizando tiras reactivas preparadas con cócteles conteniendo 0,6 mg de p-anisidina y 2 mg de BC (relación molar p-anisidina:BC 1:1,1). Estas fueron, por tanto, las composiciones empleadas de ahora en adelante.

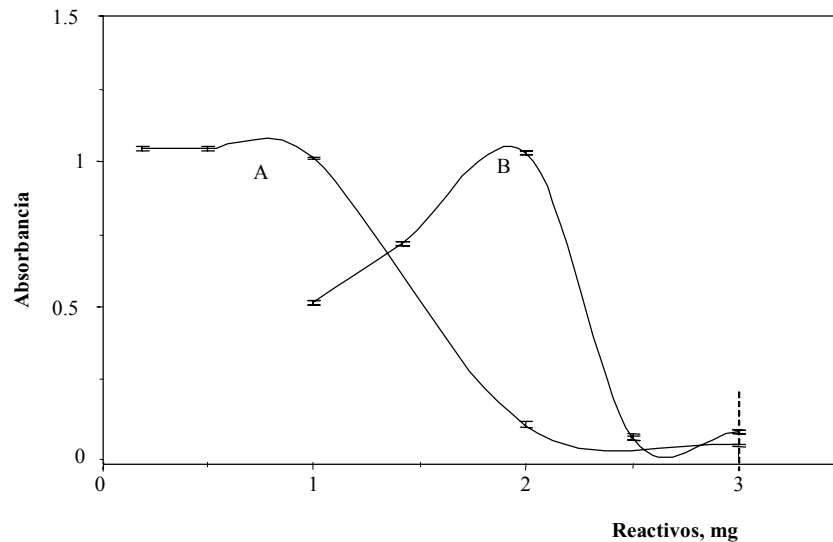


Figura 3.5. Optimización de la cantidad de p-anisidina (A) y de batocuproina (B).

En el caso de la capa externa se comprobó que la proporción en la que habitualmente se utiliza el hidrogel de poliuretano D-6 para la preparación de membranas es la que da mejor resultado (0,214 g de hidrogel D-6 en 4 mL de etanol:agua (9:1)) [40].

Otros parámetros relacionados con la preparación de la tira que también pueden influir en la respuesta de la misma son el volumen de cóctel depositado sobre el soporte sólido y el tiempo de secado. Seleccionamos como volumen de cóctel 20 μ L para cada una de las capas, pues era la cantidad máxima permitida por el soporte y como tiempo de secado se necesitaron 30 minutos a temperatura ambiente.

3.2. Parámetros relacionados con el proceso de equilibrio

En presencia de cobre, la membrana sensora transparente cambia su color de incoloro a naranja debido a la formación de un complejo con máximo de absorción a 475 nm. Los valores de máximos de absorción para este complejo referenciados en bibliografía son

similares, 479 nm en alcohol isoamílico [26] y 480 nm formando un par iónico con picrato en una membrana de PVC [27].

Los parámetros experimentales relacionados con el proceso de equilibración que pueden influir sobre la respuesta del sensor son el pH, la fuerza iónica, el volumen de muestra, el tiempo de contacto entre la tira reactiva y la disolución problema y la velocidad de agitación.

La influencia del pH encontrada es similar a la encontrada por T. Saito en su estudio de membranas de PVC para retener el mismo complejo como par iónico con picrato [27]. Existe una zona independiente del pH entre 4 y 8 donde la señal se mantiene constante, y cae por debajo de 4 y por encima de 8 (figura 3.6). Así que para evitar la influencia del pH en la respuesta del sensor decidimos trabajar a un pH de 4,5 el cual fue ajustado con una disolución reguladora ácido acético/acetato sódico 1 M.

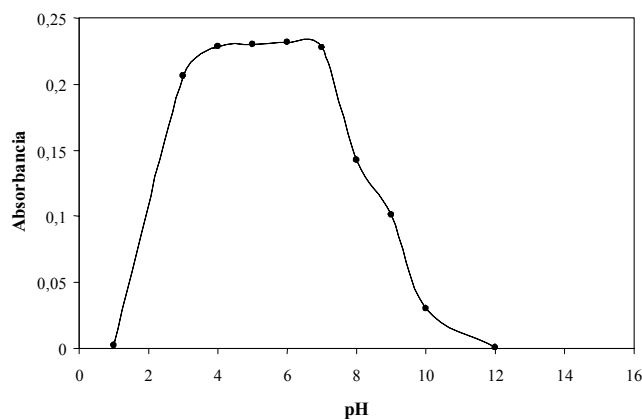


Figura 3.6. Efecto del pH ajustado con HCl y NaOH sobre la respuesta del sensor.

La influencia de la fuerza iónica sobre la respuesta de la membrana fue estudiada adicionando cantidades crecientes de NaCl a la disolución problema. Se observa que su influencia es muy pequeña hasta una concentración 0,02 M de NaCl, pues la señal analítica

solo decrece un 2,8 % con respecto a la señal obtenida sin NaCl. Sin embargo, a una concentración 0,1 M de NaCl la señal decrece hasta un 17,4 %.

Para estudiar la influencia del volumen de muestra sobre la señal analítica, se probaron volúmenes comprendidos entre 5 y 500 mL de disolución de $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Cu(II). Se observó un aumento de un 30% en la señal analítica cuando el volumen se incrementaba desde 5,0 a 50,0 mL. Desde 50,0 a 500,0 mL el incremento fue muy pequeño, del orden de un 7%. Por ello, se seleccionaron 50 mL como volumen de trabajo. Sin embargo, el uso de diferentes volúmenes haría posible adaptar el procedimiento a un amplio rango de concentraciones, ya que la sensibilidad varía según el volumen de muestra utilizado, característica propia de este tipo de tiras reactiva.

En trabajos previos [17,19-21] se ha observado que en este tipo de tiras reactivas, el tiempo de equilibración necesario para el desarrollo de la señal analítica, depende de la concentración de analito presente en la muestra. Para establecer el tiempo de equilibración necesario entre la tira reactiva y la disolución problema, se hizo un estudio cinético variando la concentración de cobre entre 0,5 y $15,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. En la Figura 3.7 se observa que la velocidad aumenta a medida que aumenta la concentración de cobre. Un aumento en el tiempo de reacción produce un aumento de señal, lo que implica que aumentando el tiempo de contacto podríamos determinar menores concentraciones de cobre.

Para obtener la respuesta del sensor en un intervalo adecuado de tiempo se observó que era necesario agitar la disolución con la tira reactiva. Se probaron diferentes tipos de sistemas de agitación (agitación magnética, agitación rotatoria y agitación vibratoria), y los mejores resultados en cuanto a coloración más homogénea de la membrana se obtuvieron con agitación vibratoria, operando a 700 oscilaciones por minuto.

3.3. Influencia de la concentración de cobre.

Se ha observado que para determinar concentraciones de analito mayores de $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ el tiempo de equilibración necesario puede ser tan pequeño como 5 minutos, mientras que si queremos determinar concentraciones de cobre del orden de $30 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, se necesita 1h de equilibración o incluso más tiempo. Esto pone de manifiesto que ambas variables experimentales, concentración y tiempo de equilibración, están estrechamente relacionadas y

que la optimización del rango analítico y del tiempo de equilibración debe llevarse a cabo simultáneamente.

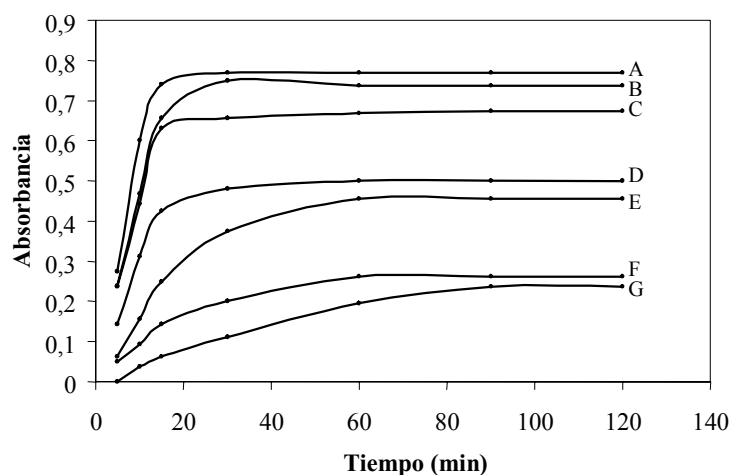


Figura 3.7. Influencia del tiempo de equilibración sobre la respuesta de la membrana para diferentes concentraciones de cobre: A) 15 mg·L⁻¹; B) 10 mg·L⁻¹; C) 5 mg·L⁻¹; D) 4 mg·L⁻¹; E) 2 mg·L⁻¹; F) 1 mg·L⁻¹; G) 0,5 mg·L⁻¹;

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la figura 3.7, la señal analítica puede expresarse como función de dos variables: $A=f(C, t)$, donde A es la absorbancia, y es una función continua y estrictamente creciente para cada una de las dos variables de las que depende C que es la concentración de analito en la disolución y t que es el tiempo de equilibración. Obteniendo esta función de calibrado $f(C, t)$, podríamos seleccionar el tiempo de equilibración óptimo para determinar con la máxima sensibilidad posible la concentración de analito en la muestra. Para simplificar el procedimiento matemático necesario para obtener esta función de calibrado, admitiremos que la función $f(C, t)$ puede considerarse una función spline $s(C, t)$, que es una función formada por segmentos polinomiales unidos mediante ciertas condiciones de suavizado [33]. En cada subintervalo $C_i \leq C \leq C_{i+1}$ y $t_i \leq t \leq t_{j+1}$ el spline interpolante puede obtenerse aplicando la siguiente ecuación 3.1 [34] a los datos experimentales $A_{i,j}$, $A_{i,j+1}$, $A_{i+1,j}$ y $A_{i+1,j+1}$ contenidos en la tabla 3.1:

$$s(C, t) = A_{ij} \frac{(C - C_{i+1})(t - t_{j+1})}{(C_i - C_{i+1})(t_j - t_{j+1})} + A_{i,j+1} \frac{(C - C_{i+1})(t - t_j)}{(C_i - C_{i+1})(t_{j+1} - t_j)} + A_{i+1,j} \frac{(C - C_i)(t - t_{j+1})}{(C_{i+1} - C_i)(t_j - t_{j+1})} + A_{i+1,j+1} \frac{(C - C_i)(t - t_j)}{(C_{i+1} - C_i)(t_{j+1} - t_j)} \quad (3.1)$$

Siendo i en esta expresión cualquier valor comprendido entre 1 y n , j cualquier valor entre 1 y m , y A_{ij} es el valor experimental de la absorbancia correspondiente a $C = C_i$ y $t = t_j$.

Tabla 3.1. Absorbancia como función de la concentración de cobre y del tiempo de equilibración.

Tiempo (min)	[Cu] $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$					
	0,5	1,0	2,0	4,0	5,0	10,0
5	0,0000	0,0500	0,0625	0,1437	0,2375	0,2378
10	0,0375	0,0930	0,1562	0,3125	0,4437	0,4687
15	0,0625	0,1437	0,2500	0,4250	0,6312	0,6562
30	0,1000	0,2000	0,3750	0,4564	0,6562	0,7300
60	0,1950	0,2625	0,4562	0,5000	0,6687	0,7375
90	0,2375	0,2625	0,4562	0,5000	0,6750	0,7375
120	0,2375	0,2625	0,4562	0,5000	0,6751	0,7374

La distribución espacial de la función spline obtenida de la interpolación de los datos experimentales de la tabla 3.1 viene representada en la figura 3.8.

Con el objeto de seleccionar el tiempo de equilibración óptimo para estimar la concentración de analito en la muestra, asumimos que este tiempo sería aquel que produce un mayor incremento en la señal analítica como consecuencia de un determinado incremento en la concentración de analito, o lo que es lo mismo, cuando la derivada numérica de la función $s(C, t_j)$ como función de C , presente un máximo. Para calcular esta derivada numérica aplicamos la siguiente expresión de derivación (ec. 3.2) que nos va a permitir obtener por aproximación la derivada $g'(a)$ de una función $g(x)$ en un punto $x = a$, cuando conocemos los valores de los puntos cercanos a $x = a$.

$$g'(a) \cong \frac{g(a+h) - g(a)}{h} \quad (3.2)$$

En esta ec. 3.2. $h \neq 0$ y $g(a+h)$ son valores de la función en el punto $a+h$ [33]. Aplicando esta expresión a los datos de la tabla 3.1, obtenemos los datos de la tabla 3.2.

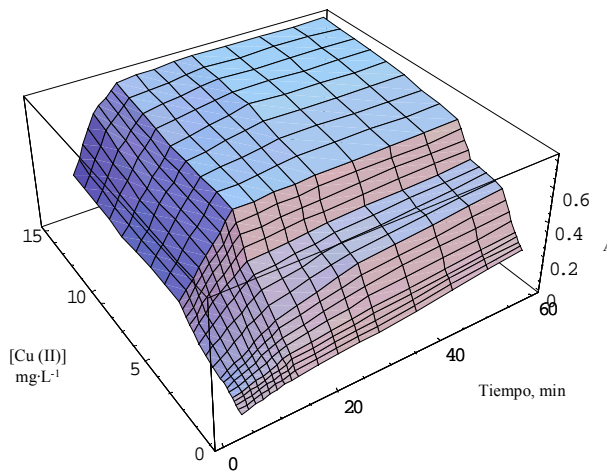


Figura 3.8. Representación gráfica de la función spline $s(C, t)$ correspondiente a los datos experimentales de la tabla 3.1.

Para estimar la concentración de analito (C_s) en una muestra real, tendríamos que seleccionar a priori el tiempo de equilibración óptimo t_j , para la concentración intermedia del rango lineal de concentraciones, luego mediríamos la absorbancia de la muestra $A_s = A(C_s, t_j)$ al tiempo t_j seleccionado. Finalmente localizaríamos el valor de i para el que se cumpla $A_{i,j} \leq A_s \leq A_{i+1,j}$ y sustituyendo este valor en la expresión de la función $s(C, t)$, obtendríamos un valor aproximado de C_s .

$$C_s = \frac{A_s(C_i - C_{i+1}) + A_{ij}C_{i+1} - A_{i+1,j}C_i}{A_{ij} - A_{i+1,j}} \quad (3.3)$$

Si el tiempo t_j previamente seleccionado resulta no ser el más adecuado para medir la absorbancia de la tira reactiva, usaremos el valor de C_s calculado para seleccionar el nuevo

tiempo óptimo, entonces volveríamos a medir la señal analítica a ese tiempo de equilibración y operaríamos de igual forma que antes.

Tabla 3.2. Valores de la derivada numérica de $s(C, t)$ como función de la concentración.

Tiempo (min)	Intervalos [Cu] $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$				
	0,5-1,0	1,0-2,0	2,0-4,0	4,0-5,0	5,0-10,0
5	0,100	0,012	0,041	0,094	0,000
10	0,111	0,063	0,078	0,131	0,005
15	0,162	0,106	0,087	0,206	0,005
30	0,200	0,175	0,041	0,199	0,015
60	0,135	0,194	0,022	0,169	0,014
90	0,050	0,194	0,022	0,175	0,012
120	0,050	0,194	0,022	0,175	0,012

3.4. Parámetros analíticos

Las funciones de calibrado se obtuvieron preparando series de 7 patrones con tres réplicas cada uno, que cubrían el rango de concentraciones comprendido entre 0,005 y 30,0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Estos patrones fueron equilibrados con distintas tiras reactivas preparadas como se ha indicado anteriormente a diferentes tiempos de equilibración, 5, 15, 30 y 60 minutos. La linealidad de estas funciones de calibrado se comprobó mediante la aplicación de un test de fallo de ajuste, como recomienda el Analytical Methods Committee [35].

La funciones lineales obtenidas para los distintos tiempos de equilibración utilizando tiras reactivas que sólo llevaban la capa sensible a cobre fueron: para 5 minutos $A = 0,0086 + 0,0285 C$; para 15 minutos $A = 0,0085 + 0,1110 C$; para 30 minutos $A = 0,0190 + 0,1986 C$; para 60 minutos $A = 0,0618 + 0,2410 C$. En el caso tiras reactivas que llevaban la doble capa sensible a cobre y de diálisis las funciones lineales para los distintos tiempos de equilibración fueron: para 15 minutos $A = 0,037 + 0,067 C$; para 30 minutos $A = 0,075 + 0,074 C$; para 60 minutos $A = 0,017 + 0,298 C$. En todos los casos A representa la absorbancia, expresada como diferencia entre la absorbancia de la muestra o patrón y la absorbancia del blanco a la misma longitud de onda, y C la concentración de cobre en la muestra o patrón expresada en

$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Como era de esperar la ubicación de una nueva membrana dializadora sobre la membrana sensora supone una reducción de la sensibilidad, aunque un aumento de selectividad como se indica más adelante.

La precisión expresada como desviación estándar relativa (DER) se evaluó para los distintos tiempos de equilibración (5, 15, 30 y 60 minutos). Para ello, en cada caso se eligió un nivel de concentración intermedio en el rango dinámico lineal, y se midieron 10 réplicas del mismo con diferentes membranas. Los límites de detección y cuantificación, calculados según la IUPAC, se determinaron a partir de diez blancos [36-38]. La tabla 3.3 nos muestra estos y otros parámetros analíticos.

Tabla 3.3. Parámetros analíticos a diferentes tiempos de equilibración.

Parámetros	Unidades	Tira reactiva monocapa				Tira reactiva bicapa		
		5 min	15 min	30 min	60 min	15 min	30 min	60 min
Ordenada en el origen	---	$8,65 \times 10^{-3}$	$8,9 \times 10^{-3}$	0,0190	0,0618	0,037	0,075	0,017
Pendiente	$\text{mg}^{-1}\cdot\text{L}$	0,0285	0,111	0,1986	0,2410	0,067	0,074	0,298
Test de fallo de ajuste	%	15,75	13,53	93,24	43,99	29,16	7,51	40,37
Rango dinámico lineal	$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	0,3 – 5,0	0,07 - 4,0	0,04 – 2,0	0,03 - 2,0	0,44 -5,0	0,27-5,0	0,05-1,0
Límite de detección	$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	0,059	0,020	0,011	0,009	0,134	0,080	0,015
Límite de cuantificación	$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	0,263	0,067	0,037	0,031	0,447	0,270	0,050
DER*	%	4,3	4,8	5,1	4,2	6,41	5,82	7,80

Además de estos parámetros se calculó el tiempo de vida de la tira, que era de 1 mes, aunque puede ser aumentado mediante el uso de un sistema de preservación adecuado que la mantenga alejada de la luz y de las altas temperaturas. Se hizo un cálculo aproximado del coste de la tira, que salió de 0,09 €/tira.

3.5. Selectividad

Con el fin de examinar los efectos producidos por posibles especies interferentes en la respuesta del sensor, se probaron una serie de iones alcalinos, alcalinotérreos, otros iones metálicos y aniones que pudieran estar presentes en las muestras de plasma. La única especie interferente encontrada fue el hierro en sus dos estados de oxidación, como Fe (II) y Fe (III). Cuando éste se encuentra a un nivel tres veces superior al nivel de cobre en la muestra, las membranas se ponen de color violeta y no cambian en presencia de cobre. También hay que tener en cuenta la interferencia debida a las proteínas, ya que por encima de $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ impiden totalmente la reacción con cobre y la membrana no se colorea.

Aplicación a suero humano

Para eliminar la interferencia debida a las proteínas presentes en el suero humano a concentraciones entre 60 y $78 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ [39], sin necesidad de desproteinizar se cubrió la capa sensible a cobre con un polímero utilizado como membrana de diálisis. Se ensayaron diferentes tipos de polímeros para formar la capa externa del sensor. De todos los polímeros ensayados (acetato de polivinilo, quitosan, acetato de celulosa y diferentes tipos de hidrogeles de poliuretano) solo el hidrogel de poliuretano D6 dio buenos resultados. Para seleccionar la cantidad adecuada de disolución de hidrogel D6, se prepararon tiras reactivas con la membrana sensible a cobre antes comentada y con una capa dializadora variando entre 5 y $30 \mu\text{L}$ el volumen de disolución $5,35\%$ de hidrogel. Se observa que la respuesta de las tiras reactivas en presencia de una cantidad constante de Cu(II) y de proteína aumenta hasta $15 \mu\text{L}$. Por ello, se prepararon las tiras reactivas utilizando $20 \mu\text{L}$ de disolución de hidrogel de manera que la capa inferior quedaba recubierta y el conjunto era ópticamente transparente. Empleando la tira reactiva bicapa descrita, es posible eliminar la interferencia de proteínas a niveles de concentración inferiores a $2,6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Figura 3.9).

En la Tabla 3.3 puede observarse que el límite de detección disminuye a medida que el tiempo de contacto aumenta. Además, la sensibilidad y la reproducibilidad disminuyen en la membrana bicapa con respecto a las tiras reactivas de tipo monocapa.

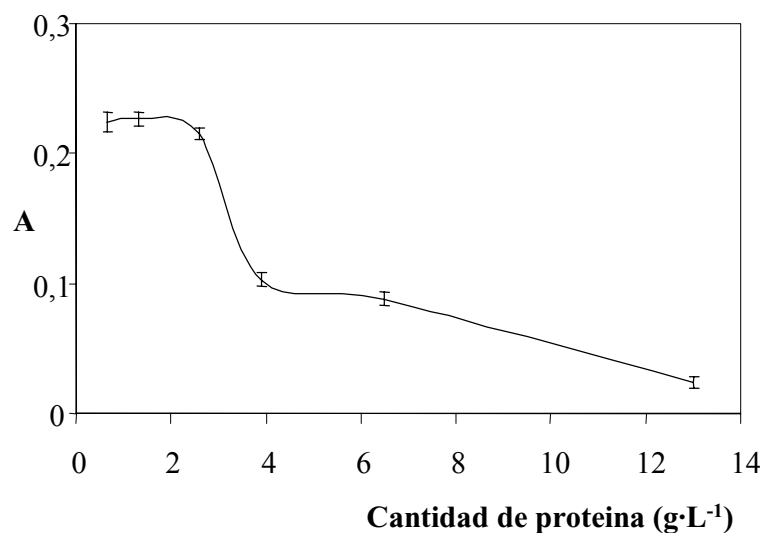


Figura 3.9. Influencia de la cantidad de proteínas en la determinación de 1 mg·L⁻¹ de cobre.

3.6. Aplicaciones y validación

Con el objetivo de comprobar la utilidad y validez del procedimiento propuesto se aplicó este a diferentes muestras de plasma humano. El método no puede aplicarse cuando haya ocurrido hemolisis en la muestra. En la Tabla 3.4 observamos los resultados obtenidos por el procedimiento propuesto y por el de referencia, que fue el método Boehringer Mannheim para la determinación de cobre en plasma (MPR1) que usa disulfonato de batocuproina como reactivo después de desproteinizar la muestra de suero. Los valores reflejados en dicha tabla corresponden a la media de tres réplicas de cada muestra para cada uno de los métodos. También está incluida la desviación estándar de estas réplicas, el valor experimental de la t-student así como el valor P del test de comparación de medias, que nos indica que en ningún caso existe diferencia significativa entre los resultados obtenidos utilizando la tira reactiva desarrollada y los resultados obtenidos mediante el método de referencia, pues siempre el valor $P_{\text{value}} > 5\%$ en todos los casos.

Tabla 3.4. Determinación de cobre en diferentes muestras de plasma sanguíneo usando MPR1 como método de referencia

	Método propuesto (mg·L ⁻¹)	Método de referencia (mg·L ⁻¹)	T _{exp}	P _{val} (%)
Plasma pool-1	1,00±0,07	1,01±0,03	0,23	83,29
Plasma pool-2	1,47±0.02	1,45±0,04	0,77	49,79
Plasma pool-3	1,19±0.09	1,16±0,02	0,05	95,67
Plasma pool-4	0,79±0.07	0,96±0,05	0,46	69,06
Plasma pool-5	1,24±0.05	1,23±0,04	0,03	97,88

4. Conclusiones

Se ha desarrollado una tira reactiva para la determinación de cobre en plasma. La tira reactiva propuesta es de tipo óptico, en la que se mide la absorbancia por transmisión y ofrece buena repetibilidad, un tiempo de respuesta que no es excesivamente largo, pudiendo considerarse como una alternativa barata para obtener información analítica.

La tira reactiva propuesta permite la determinación de cobre en muestras de plasma humano y además ofrece la ventaja de no requerir la eliminación de las proteínas presentes en el plasma; siendo el único tratamiento necesario una simple dilución de la muestra de plasma. Los resultados obtenidos usando esta tira reactiva presentan buena exactitud y precisión, lo que añadido a su bajo costo, la hacen potencialmente útil para su utilización en análisis rutinarios utilizando instrumentación portátil. Su uso es compatible con un LED azul y podría utilizarse también en análisis semicuantitativos utilizando una carta de color.

Debe señalarse que el método propuesto presenta el inconveniente de que la tira reactiva presenta un tiempo de vida limitado, un mes, lo que podría mejorarse mediante el empleo de algún sistema de conservación (ausencia de luz y baja temperatura).

Agradecimientos

Al Ministerio de Educación y Cultura, Dirección General de Enseñanza Superior (Proyecto N° PB98-1302) por su financiación.

Bibliografía

- [1] M. Unger-Heumann, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 354, 803 (1996).
- [2] Y. Zolotov, *Ann. Chim.*, 87, 285 (1997).
- [3] B. Walter, *Anal. Chem.*, 55, 498A (1983).
- [4] W. Poppe, R. van Rijkevorsel, U. Rüppender y H. Mache, U.S. Pat. No. 4,592,893 (1986).
- [5] S. Luo, P. Lo, H.P. Groger y R.J. Churchill, U.S. Pat. No. 6,051,437 (2000).
- [6] D. Kutter, *Clin. Chim. Acta*, 297, 297 (2000).
- [7] H. Starp, N. Buschmann and K. Cammann, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 368, 203 (2000).
- [8] J. Wang, in P.G. Edelman y J. Wang (editors), *Biosensors and Chemical Sensors*, American Chemical Society, Washington, DC, pp. 125 (1992).
- [9] J.M. Gleisner, US Pat., No. 5,128,171 (1992).
- [10] E.P. Przybyłowicz and A.G. Millikan, US Pat., No. 3,992,158 (1976).
- [11] E.C. Adams, R.R. Smeby, US Pat. No. 3,092,465 (1963).
- [12] S.C. Charlton and B. Walter, US Pat No. 4,776,904 (1988).
- [13] K. Hildenbrand, H.H. von Döhren, H. Perrey y K. Wehling, U.S. Patent No., 4,824,640 (1989).
- [14] C. Krause, T. Werner y O. Wolfbeis, *Anal. Sci.*, 14, 163 (1998).
- [15] I. Oehme y O. Wolfbeis, *Mikrochim. Acta*, 126, 177 (1997).

[16] L.F. Capitán-Vallvey, R. Avidad Castañeda, M.D. Fernandez Ramos, P. Alvarez de Cienfuegos y A. Ariza Avidad, Oficina Española de Patentes y Marcas, Patent pending, No. P9900718 (1999).

[17] L.F. Capitán-Vallvey, E. Arroyo, C. Berenguer, M.D. Fernández Ramos y R. Avidad Castañeda, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 369,139 (2001).

[18] L.F. Capitán-Vallvey, P. Alvarez de Cienfuegos-Gálvez, M.D. Fernández Ramos y R. Avidad Castañeda, *Sens. Actuators B*, 71, 140 (2000).

[19] L.F. Capitán Vallvey, R. Avidad Castañeda, M.D. Fernández Ramos y A. Ariza Avidad, Oficina Española de Patentes y Marcas, Patent pending, No. P200002623 (2000).

[20] L.F. Capitán-Vallvey, Osama M.A. Al-Barbarawi, M.D. Fernández Ramos, R. Avidad Castañeda y V. Ramírez González, *Analyst*, 125, 2000 (2000).

[21] L.F. Capitán-Vallvey; M.D. Fernández Ramos, R. Avidad Castañeda y M. K.A. Deheidell, *Anal. Chim. Acta*, 40, 131 (2001).

[22] R. Cornelis, B. Heinzow, F.R.M. Herber, J. Molin Christensen, O.M. Poulsen, E. Sabbioni, D.M. Templeton, Y. Thomassen, M. Vahter and O. Vesterberg, *Pure Appl.Chem.*, 67, 1575 (1995).

[23] A. Goth, *Farmacología Médica*, Doyma, Barcelona, p. 685 (1984).

[24] N. Malçik, P. Çağlar y R. Narayanaswamy, *Quim. Anal.*, 19, 94 (2000).

[25] I. Oehme, B. Prokes, I. Murkovic, T. Werner, I. Klimant y O.S. Wolfbeis, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 350, 563 (1994).

[26] Z. Marczenko, *Separation and Spectrophotometric Determination of Elements*, Ellis Horwood Pub., pp. 262 (1986).

[27] T. Saito, *Talanta*, 41, 811(1994).

[28] J.W. Fohrster, K. Ewing, A. Ervin y L. Lamontagne, WIPO PCT Patent No. WO 99/47917 (1999).

[29] A.M. Ervin, K.J. Ewing, G. Nau, D.A. Rowley, R.A. Lamontagne y I.D. Aggarwal, *Sens. Actuators B*, 53, 104 (1998).

-
- [30] K. Seiler, y W. Simon, *Anal. Chim. Acta*, 266, 73 (1992).
- [31] W.M. Banick y G.F. Smith, *Anal. Chim. Acta*, 16, 464 (1957).
- [32] R. Cornelis, *Ann. Clin. Lab. Sci.*, 26, 252 (1996).
- [33] W. Cheney y D. Kincaid, *Numerical Mathematics and Computing*, Book/Cole, 100 (1980).
- [34] E. Isaacson y H. B. Keller, *Análisis of Numerical Methods*. John Wiley & Sons, 295 (1966).
- [35] Analytical Methods Committee, *Analyst*, 119, 2363 (1994).
- [36] Analytical Methods Committee, *Analyst*, 113, 1469 (1988).
- [37] Guidelines for data acquisition, *Anal. Chem.*, 52, 2242 (1980).
- [38] Nomenclature, symbols, units and their usage in spectrochemical analysis, *Spectrochim. Acta (B)*, 33B, 242 (1978).
- [39] J.B. Henry (Editor), *Chemical Diagnostics Menagement by Laboratory Methods*, 19 ed., Sanders, (1996).
- [40] O. S. Wolfbeis, I. Klimant, T. Werner, C. Huber, U. Kosch, C. Krause, G. Neurauter, A. Dürkop, *Sensors and Actuators B*, 51, 17 (1998).

CAPÍTULO 4
DETERMINACIÓN DE COBRE EN
AGUA MEDIANTE UN SENSOR
ÓPTICO DE UN SOLO USO
BASADO EN TRANSFERENCIA DE
ENERGÍA DE RESONANCIA

DETERMINACIÓN DE COBRE EN AGUA MEDIANTE UN SENSOR ÓPTICO DE UN SOLO USO BASADO EN TRANSFERENCIA DE ENERGÍA DE RESONANCIA

Resumen

En este capítulo se desarrolla un sensor óptico de un solo uso para la determinación de Cu (II) en agua, basado en la medida de los cambios de intensidad de fluorescencia de la porfirazina 2,7,12,17-tetra-tert-butil-5,10,15,20-tetraaza-21H,23H-porfirina (TP). El sensor fue construido sobre un soporte de poliéster depositando sobre el mismo una disolución de PVC que contenía TP, un plastificante, el agente quelante Zincon y cloruro de bencetonio para formar un par iónico con Zincon. El principio de medida se basa en la transferencia de energía de resonancia (RET) entre la TP inmovilizada en la membrana, actuando ésta como donador, y el complejo Zincon-Cu (II), que actúa como aceptor. El espectro de absorción del complejo Zincon-Cu (II) solapa con el espectro de emisión de la TP, condición necesaria para que tenga lugar el proceso RET.

El sensor responde irreversiblemente a cobre (II) en el rango de concentraciones que va desde $0,039$ a $14 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($2,5 - 890 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), presentando una reproducibilidad del 1,9% (DER) expresada en términos de $\log a_{\text{Cu}^{2+}}$, para una concentración intermedia en el rango dinámico lineal y un tiempo de equilibración de 10 minutos. El procedimiento fue aplicado a una serie de muestras de agua de diversa procedencia (de río, pozo, manantial y piscina), y los resultados obtenidos fueron contrastados con un método de referencia.

1. Introducción

La determinación de cantidades traza de iones metálicos presenta un gran interés en campos como el análisis medioambiental y el control de procesos industriales y reacciones químicas. Tradicionalmente, se han utilizado la espectroscopia de masas y la espectroscopia de absorción atómica o molecular como técnicas para llevar a cabo el análisis de iones metálicos. Aunque estas técnicas son extremadamente sensibles, llegando a alcanzar niveles de concentración subnanomolares, presentan los inconvenientes de que son técnicas difíciles de usar y que no son útiles para llevar a cabo análisis *in situ*. En este sentido, teniendo en cuenta la gran cantidad de muestras de agua que diariamente se analizan y que en realidad no están contaminadas con metales de transición, el desarrollo de sistemas de screening rápidos y sencillos es de gran importancia para seleccionar *a priori* las muestras a analizar.

Una de las posibles soluciones al respecto es el desarrollo de sensores de un solo uso, que se pueden considerar idealmente como dispositivos analíticos autocontenidos que responden a la presencia o concentración de un determinado analito o analitos, basados normalmente en el uso de una reacción química o bioquímica. Los reactivos necesarios para las reacciones y procesos que darán lugar a la respuesta analítica buscada se encuentran incorporados en el dispositivo, normalmente en formato seco, de manera que no sea necesario prepararlos ni mezclarlos, ni llevar a cabo operaciones de extracción, precipitación, diálisis, etc. Diferentes sensores de un solo uso han sido diseñados para la determinación de iones metálicos especialmente en el campo del análisis medioambiental basados principalmente en la medida de propiedades ópticas o eléctricas [1-3]. El principal inconveniente que presentan estos sensores es una sensibilidad baja, no llegando en muchos casos a los niveles requeridos, lo que junto a una selectividad insuficiente frente a otros iones metálicos y a una baja exactitud, hace que nos lleven a conclusiones semicuantitativas.

El diseño de los sensores de un solo uso pasa por la elección de un mecanismo de transducción adecuado que transforme la reacción de reconocimiento del analito en una propiedad analítica medible. Se han propuesto bastantes mecanismos de transducción, entre ellos, mecanismos de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (RET) que implican atenuación de fluorescencia vía dipolo-dipolo [4]. En ellos, el aumento de

selectividad viene dado por el requerimiento del solapamiento entre el espectro de emisión del donador y el espectro de absorción del aceptor para que tenga lugar el proceso RET [5].

La transferencia de energía tipo Förster se ha utilizado en la construcción de diferentes sensores para la determinación de elementos tales como yodo [6], aniones como cloruro [7] o fluoruro [8], compuestos orgánicos como ácido pícrico [9] y gases como CO₂ [10] o NH₃ [11], pudiendo utilizarse incluso para la determinación de analitos inmunogenicos y haptenos [12] y analitos con afinidad por ADN [13].

Diferentes estrategias basadas en RET han sido utilizadas para la determinación de iones metálicos, bien utilizando medidas de intensidad luminiscente [14] o bien utilizando medidas de tiempo de vida [15]: i) Uno de los esquemas más simples que podemos encontrar es aquel que implica el uso de acuocomplejos de iones metálicos de transición, que debido a transiciones d-d dan lugar a absorciones en el ultravioleta, en el visible y en el infrarrojo cercano pudiendo actuar como aceptores de diferentes donores embebidos en membranas de Nafion, como es el caso de un sensor descrito para Co (II) que utiliza perileno como donador [15], o de un sensor para Cu (II) basado en lumogen orange como donador [5] o del sensor para Cu (II) que utiliza como donador Rodamina 800 [16,17]; ii) También se han utilizado como aceptores reactivos cromogénicos convencionales capaces de complejar iones metálicos en conjunción con indicadores fluorescentes utilizados como donores. Dentro de este tipo podemos citar un sensor para Cu (II) basado en el uso de N,N,N',N'-tetra-metiletildiamina y Rojo Texas X como donador [17], o un sensor para Cu (I) basado en batocuproina junto con perileno que actúa como donador [18]. Alternativamente, se pueden utilizar como donores complejos fosforescentes, este es el caso del complejo Al-Ferron utilizado en conjunción con ditizona para el screening de iones metálicos de transición [19]; iii) una tercera estrategia supone el reconocimiento del ión metálico mediante el uso de un ionóforo acoplado a una reacción indicadora que implica a su vez el uso de un cromioionóforo como aceptor y un luminóforo como donador, este es el caso del uso de membranas de PVC para determinar potasio conteniendo valinomicina y el par iónico rutenio (II) tris-4,4'-difeníl-2,2'-bipiridil azul de bromotimol [20]; iv) una cuarta estrategia se basa en el uso de un apoenzima marcado fluorescentemente, tal como la anhidrasa carbonica para Co (II) y Cu (II), y el solapamiento de su espectro de emisión fluorescente con las bandas de absorción d-d del ión metálico en cuestión [21]; v) esta siguiente estrategia supone la utilización de cambios

conformacionales inducidos por iones metálicos, tales como α -polipéptidos arrollados helicoidalmente conteniendo tanto grupos histidina para la unión de Ni(II) como grupos donores/aceptores de energía [14]; vi) una última estrategia descrita supone un proceso RET intramolecular, que combina en una misma molécula la existencia de un donador fluorescente dependiente del analito y un aceptor fluorescente. Este es el caso de un sistema supramolecular que contiene un derivado del triazol con gran afinidad hacia Al (III), conectado por medio de un espaciador etileno a una cumarina 343 [22] o el caso de un sensor para sodio basado en el uso de un calix[4]areno conteniendo pireno como donador y un antroiloxi derivado como aceptor [23].

El uso de mecanismos de transducción tipo RET en el diseño de sensores de un solo uso puede proporcionar un aumento de sensibilidad y selectividad con respecto al uso de reactivos cromogénicos convencionales, especialmente si medimos intensidad de fluorescencia, no suponiendo en este caso un problema la irreversibilidad del sistema observada en ocasiones.

En este capítulo desarrollamos un sensor óptico de un solo uso sensible y selectivo a Cu (II) basado en el uso de transferencia de energía de resonancia (RET) entre el complejo del reactivo cromogénico Zincon (aceptor) y una porfirazina fluorescente como es la 2,7,12,17-tetra-*tert*-butil-5,10,15,20-tetraaza-21H,23H-porfirina utilizada como donador, ambos contenidos en una membrana de PVC. De esta manera se consiguen mejorar las características analíticas respecto a tiras reactivas que utilizan reactivos convencionales y que normalmente generan una respuesta en el rango de los $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

2. Experimental

2.1. Instrumentación y software

Para llevar a cabo las medidas de absorbancia se utilizó un espectrofotómetro Hewlett-Packard HP-8453 de diodos en fila conectado a un ordenador personal Pentium MMX 200 y para llevar a cabo las medidas de fluorescencia se utilizó un espectrofluorímetro Cary Eclipse (Varian Australia Pty Ltd.) conectado a un ordenador personal Pentium 4 2.40 GHz. Las medidas de tiempo de vida se llevaron a cabo utilizando un espectrofluorímetro

OB 920 (Edinburgh Instruments Ltd, Livingston, UK) basado en la técnica “time correlated single photon counting”, con una lámpara de nanosegundos 900-HP y un fotomultiplicador de fotón único S900 como sistema de detección, conectado a un ordenador personal AMD Athlon™ XP 2400+ 2.00 GHz. La recogida y tratamiento de los datos de tiempo de vida fue llevada a cabo utilizando el F900 Single Photon Fluorescence Spectrometer Software proporcionado por Edinburgh Instruments.

Las medidas de absorbancia y luminiscencia se realizaron utilizando los soportes anteriormente descritos en el capítulo de bases físico-químicas, construidos en un bloque de hierro pintado de negro y con las dimensiones adecuadas para ser utilizados en cada uno de los compartimentos de cubetas de los espectrofotómetros anteriormente citados. Las medidas de absorbancia se llevaron a cabo en un soporte con un orificio de 5 mm diámetro y una rendija perpendicular de 1 mm de espesor, donde se introduce la tira reactiva para su medida [24]. Las medidas de luminiscencia se llevaron a cabo por transmisión en un soporte con dos orificios ortogonales de 5 mm de diámetro y una rendija diagonal de 1 mm de espesor, de forma que los haces de excitación y emisión formen un ángulo de 45° con el plano del sensor [25].

El rendimiento cuántico se determinó utilizando un espectrofotómetro Cary 50 Bio UV-Vis (Varian Australia Pty Ltd.), un espectrofotómetro Lambda UV P14 (Perkin Elmer Ltd., Beaconsfield, Buckinghamshire, UK) y un espectrofluorímetro Aminco-Bowman Series 2 (SLM-Aminco, Rochester, NY, US) equipado con una lámpara de xenon de onda continua de 150-w como fuente de excitación.

Las medidas de pH se llevaron a cabo utilizando un pH-metro digital provisto de electrodo combinado de vidrio y cloruro de plata (Crison, Barcelona, España) calibrado a $20 \pm 2^\circ\text{C}$ con disoluciones tampón de pH 7,00 y 4,00 (Merck). Los sensores se prepararon utilizando un sistema rotatorio de velocidad de giro variable diseñado por nosotros de acuerdo con [26].

Los programas utilizados para el tratamiento de datos fueron: Statgraphics Plus Versión 6.0, STSC. Inc., de Statistical Graphics Corp., USA, 1993, GraphMatica para Win32 v1.60d, 1998 editado por K. Hertzler y adaptado por J. Garrido y PhotochemCAD HD1.1 desarrollado por H. Du, R.A. Fuh y J.S. Lindsey, 1998.

2.2. Reactivos y materiales

Todos los reactivos utilizados eran de grado analítico y el agua utilizada para preparar las disoluciones procedía de un equipo de ósmosis inversa Milli-Ro 12 acoplado a un equipo Milli Q de Millipore Corp, Bedford, MA.

Las disoluciones madre ($1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) se prepararon en agua a partir de los correspondientes nitratos de cobre, cadmio (Panreac, Barcelona, Spain), mercurio(II) (Probus, Barcelona, Spain), níquel, plomo, y aluminio (Merck, Darmstadt, Germany), a partir de los correspondientes sulfatos de cinc y manganeso (Merck), y a partir de los correspondientes cloruros de hierro(III), calcio (Panreac) y magnesio (Merck). Las distintas disoluciones fueron estandarizadas mediante valoración o utilizando espectrometría de absorción atómica. La disolución reguladora de pH 7,0 2 M fue preparada a partir de cloruro amónico y amoniaco (ambos de Panreac).

Para preparar las membranas sensoras se utilizaron los siguientes reactivos: cloruro de polivinilo (PVC; de alto peso molecular), 2, 7, 12, 17-tetra-tert-butil-5, 10, 15, 20-tetraaza-21 H, 23 H porfirina (TP), 2-carboxi-2'-hidroxi-5'-sulfoformazilbenzeno (Zincon), tributilfosfato (TBP), 2-nitrofeniloctileter (NPOE), bis(2-etilhexil)sebacato (DOS), dioctilftalato (DOP), tris(2-etilhexil)fosfato (TEHP), bromuro de tetrabutilamonio (TBAB), cloruro de tridodecilmetilamonio (TDMAC), bromuro de tetradeciltrimetilamonio (TDTMAB), bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HDTMAB), cloruro de bencetonio (BC) y tetrahidrofurano (THF), todos ellos proporcionados por Sigma (Sigma-Aldrich Química S. A., Madrid). Como soporte sólido de las membranas sensoras se utilizaron láminas de poliéster tipo Mylar (Goodfellow, Cambridge, UK).

2.3. Preparación de la membrana sensora y sistema de medida

La disolución a partir de la cual vamos a preparar las membranas se obtiene pesando 30,0 mg (31,06 % p/p) de PVC, 64,0 mg (66,26 % p/p) de TBP, 0,50 mg (0,52 % p/p) de TP, 0,43 mg (0,45 % p/p) de Zincon y 1,66 mg (1,72 % p/p) de BC en un vial de vidrio y disolviéndolos en 1,0 ml de tetrahidrofurano recién destilado. Se depositan 15 μL de ese cóctel sobre una lámina de poliéster de 14 mm \times 40 mm \times 0,5 mm de espesor, con ayuda del

sistema centrífugo de preparación de membranas [26] girando a 180 rpm. Tras dejar la membrana girando durante 30 segundos, se deja estar en un recipiente hermético con atmósfera saturada de tetrahidrofurano durante 3 minutos a temperatura ambiente y luego se almacena en un lugar protegido de la luz hasta su posterior uso. La zona sensora obtenida de este modo es una película circular sólida, homogénea, adherida al soporte sólido, transparente, de color rojo-violáceo, de 12 mm de diámetro y aproximadamente 13 μm de espesor. Las concentraciones de Zincon, TP y BC en la membrana sensora una vez seca son 9,63 $\text{mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$; 9,61 $\text{mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$ y 38,35 $\text{mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$, respectivamente.

La respuesta de los diferentes sensores así preparados se evaluó disponiendo 25 mL de una disolución patrón conteniendo entre 0,039 y 14 μM (en concentraciones) de Cu (II) y 2,5 mL de disolución reguladora cloruro amónico/amoniaco de pH 7,0 y concentración 2 M, en un frasco de vidrio topacio de 30 mL de volumen. A continuación, se equilibra la membrana durante diez minutos en un agitador vibratorio a 800 oscilaciones por minuto, y tras la equilibración se extrae la membrana, se sacude para eliminar las gotas de disolución que la puedan mojar, y se mide su intensidad de fluorescencia excitando a 335 nm y registrando la emisión a 630 nm, utilizando rendijas de 5 nm tanto en excitación como en emisión. El soporte de Mylar no es fluorescente en estas condiciones de medida, por lo que no es necesario sustraer la señal del blanco. Todas las medidas se llevaron a cabo a temperatura ambiente (20 ± 3 °C) y no fue necesario precondicionar las membranas antes de usarlas.

2.4. Cálculos

El valor de intensidad de fluorescencia máximo (F_1) corresponde al agente complejante Zincon totalmente libre y se mide para cada sensor antes de usarlo con objeto de calcular posteriormente los valores de α . El valor de intensidad de fluorescencia mínimo (F_0) corresponde al Zincon totalmente complejo obtenido después de poner en contacto al sensor con una disolución 10^{-4} M de Cu (II). Las actividades se calcularon utilizando la aproximación de Debye-Hückel [27]. La constante de extracción K_e se calculó de acuerdo con la referencia [28], utilizando los valores de la zona de máxima pendiente de la función respuesta a cobre, lo que proporciona menos error.

El rendimiento cuántico de la porfirazina TP en membrana (Φ_D) fue estimado utilizando la siguiente expresión:

$$\phi_D = \phi_R \frac{A_R(\lambda_R)}{A_D(\lambda_D)} \cdot \frac{n_D^2}{n_R^2} \cdot \frac{D_D}{D_R} \quad (4.1)$$

El rendimiento cuántico de referencia (Φ_R) utilizado fue el de la misma especie fluorescente pero en cloroformo ($\Phi_R = 0,21$ [29]) pues ese valor está descrito en bibliografía. $A_D(\lambda_D)$ es la absorbancia de la tira reactiva a la longitud de onda de excitación (335 nm), y $A_R(\lambda_R)$ es la absorbancia de la disolución de referencia preparada con una concentración de especie fluorescente tal que el valor de absorbancia fuera similar a $A_D(\lambda_D)$. El índice de refracción de la membrana (n_D) se calculó como una media ponderada a partir de los índices de refracción de los dos componentes principales en la membrana (TBP y PVC), obteniéndose un valor de 1,46. Como índice de refracción de referencia (n_R) se utilizó el del cloroformo (1,44). El área bajo el espectro de emisión corregido de la membrana (D_D) y de la disolución (D_R) se obtuvieron excitando en ambos casos a 335 nm ($D_D=53,06$; $D_R=350,90$).

Los valores de absorptividad molar del aceptor $\epsilon_A(\lambda)$ en la membrana se calcularon para el rango de longitudes de onda comprendido entre 590 y 750 nm (zona de solapamiento) utilizando la ley de Lambert-Beer para un camino óptico (espesor de la membrana) de 0,0013 cm y una concentración de Zincon en membrana de $0,00967 \text{ mol}\cdot\text{Kg}^{-1}$, habiendo equilibrado previamente la membrana con una disolución de Cu (II) $1,0\cdot 10^{-5} \text{ M}$.

3. Resultados y discusión

3.1. Esquema de sensado

El esquema de sensado utilizado en el sensor aquí desarrollado se basa en un proceso de extracción entre la membrana de PVC y la disolución problema conteniendo al analito [30]. En este mecanismo la unión entre cobre y agente quelante se pone de manifiesto por transferencia de energía de resonancia (RET) midiendo la intensidad de fluorescencia de un donador fluorescente presente en la membrana.

La transferencia de energía de resonancia (RET) puede definirse como un proceso de atenuación de fluorescencia bimolecular que tiene lugar entre el estado excitado de una especie donora fluorescente y el estado fundamental de un especie aceptora, transfiriéndose la energía por un proceso no radiativo de acoplamiento dipolo-dipolo [31]. Este proceso supone una vía extra de relajación del estado excitado de la especie donora además del habitual proceso de emisión de fluorescencia intrínseca y de otros procesos no radiativos, y modifica la ley de decaimiento de intensidad de fluorescencia del donador. Para que tenga lugar el proceso RET es necesario que ocurra solapamiento entre el espectro de emisión del donador y el espectro de absorción del aceptor, dependiendo la eficiencia del proceso en gran medida del grado de solapamiento que tenga lugar y de la distancia entre donador y aceptor, según la teoría de Förster [4].

La tira reactiva aquí desarrollada requiere de la presencia de dos reactivos distribuidos homogéneamente en la membrana, uno de ellos actúa como reactivo sensible a cobre y origina la especie aceptora del proceso RET y el otro reactivo actúa como donador del proceso RET y su emisión viene modulada por las variaciones en la concentración de Cu (II). Los requerimientos tenidos en cuenta a la hora de desarrollar esta tira reactiva han sido los siguientes: 1) selección de un reactivo sensible y selectivo al analito, en nuestro caso cobre, teniendo en cuenta que la reversibilidad no es una condición esencial para desarrollar un sensor de un solo uso; 2) que exista un significativo cambio en el espectro de absorción del reactivo sensible a cobre tras su reacción con el metal; 3) que el solapamiento entre el espectro de absorción de la especie aceptora y una de las bandas de emisión del espectro del donador sea considerable; 4) que el solapamiento entre el espectro de absorción del reactivo sensible a cobre libre y el espectro de emisión del donador sea insignificante; 5) que la emisión del donador sea independiente de la concentración de analito; 6) que la distancia entre donador y aceptor no exceda de los 100 Å; 7) que el donador presente un alto rendimiento cuántico; 8) que tanto donador como aceptor sean solubles en la membrana hidrofóbica; 9) que tanto donador como aceptor sean altamente lipofílicos para mantenerlos en la membrana sin que lixivien.

Como reactivo sensible a cobre se seleccionó Zincon (2-carboxi-2'-hidroxi-5'-sulfoformazilbenceno), que es un reactivo complejante de tipo O,N donador que ha sido ampliamente utilizado para la determinación de cinc y cobre [33]; [32]; [34]. Fue seleccionado debido al desplazamiento batocrómico que mostraba tras su complejación con

cobre; así como por la buena selectividad que presentaba hacia cobre a valores de pH entorno a 7; por otra parte, presentaba poca dependencia del pH y era posible inmovilizarlo en la membrana por formación de un par iónico a través de su grupo sulfónico.

Como donador seleccionamos una porfirazina, que se diferencia de las porfirinas en que presenta cuatro átomos de nitrógeno en posición meso en vez de los cuatro grupos metino del anillo central. Estos compuestos se caracterizan por poseer una alta simetría, planaridad y deslocalización electrónica. La porfirazina seleccionada fue la 2,7,12,17-tetra-tert-butil-5,10,15,20-tetraaza-21 H,23 H porfirina, que no es atenuada por oxígeno y que no reacciona con cobre, además de que presenta un espectro de emisión y un rendimiento cuántico (0,21 en Cl_3CH [29], 0,11 en benceno [35]) adecuados para su uso en el desarrollo de este sensor desechable.

El espectro de absorción de la membrana de PVC conteniendo sólo Zincon presenta un máximo a 540 nm, que se desplaza a 630 nm tras la complejación con cobre, hecho que contrasta con lo encontrado en bibliografía para disolución a pH 6, donde se encuentra un máximo a 465 nm que se desplaza a 600 nm tras la complejación con cobre ($\epsilon = 1,9 \cdot 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) [34].

El espectro de absorción de la porfirazina seleccionada presenta un desdoblamiento de la banda Q debido a la baja simetría del orbital D_{2h} , lo que elimina la degeneración del orbital molecular más bajo desocupado (LUMO) [36], con bandas principales a 550 y 621 nm y una banda B a 335 nm. El espectro de emisión está formado por dos bandas, una a 630 nm, que obviamente solapa con la banda de absorción del complejo Zincon-Cu (II), y otra más pequeña a 690 nm [35] (Figura 4.1). Cuando ponemos en contacto al sensor con una disolución de cobre tiene lugar el transporte del mismo hacia la membrana donde se origina el complejo con Zincon y, como consecuencia de la complejación, disminuye la intensidad de la banda de emisión de la porfirazina a 630 nm excitando a 335 nm.

En presencia de cobre tanto la intensidad de fluorescencia como el tiempo de vida del sensor disminuyen, lo que indica que hay transferencia de energía de Förster. Tras introducir una membrana sensora en una disolución $1,0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ de Cu (II) a pH 7,0, su tiempo de vida medio decrece desde 1,9 ns a 0,8 ns (Figura 4.2). Los tiempos de vida de la membrana sensora antes y después de haber estado en contacto con la disolución de cobre anteriormente

mencionada, se adaptan a un modelo de decaimiento biexponencial [antes de la reacción: τ_1 1,2 ns (95%), τ_2 16,7 (5%), χ^2 1,264; después de la reacción: τ_1 0,4 ns (96%), τ_2 10,5 (4%), χ^2 1,189].

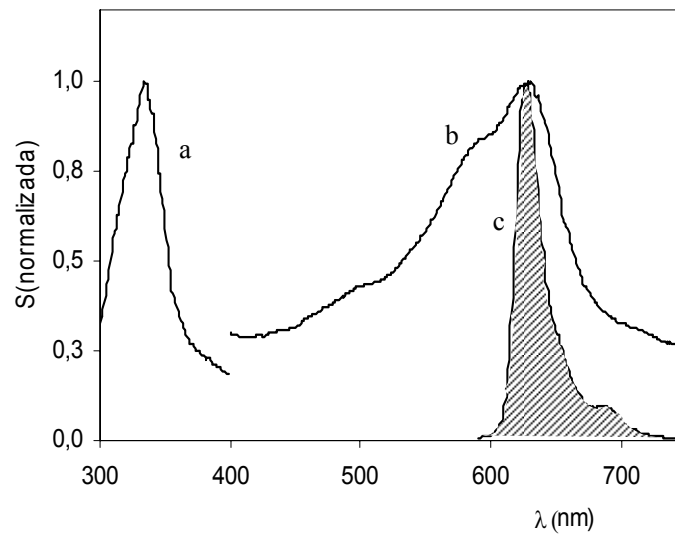


Figura 4.1. Espectros de absorción normalizados del complejo Zincon-Cu (II) (b) y de la TP (a) y espectro de emisión normalizado de la TP (c), todos ellos en membrana de PVC.

Con objeto de caracterizar el proceso RET, se calculó la distancia de Förster a partir de las características espectrales del donador y del aceptor y a partir del rendimiento cuántico del donador utilizando la siguiente expresión:

$$R_0 = \frac{0.0211 \cdot \kappa^{1/3} \cdot \Phi_D^{1/6} \cdot J(\lambda)^{1/6}}{n^{2/3}} \quad (4.2)$$

En la que κ es el factor de orientación, para el que aceptamos un valor de $\sqrt{2/3}$ suponiendo que tiene lugar una rotación libre de las moléculas de donador y aceptor; Φ_D es el rendimiento cuántico del donador en la membrana y para el que se obtuvo un valor de 0,15; y n es el índice de refracción de la membrana para el que calculamos un valor de 1,46,

ambos calculados como comentamos en el apartado 2.4 de este capítulo. $J(\lambda)$, es la integral de solapamiento, que indica el grado de solapamiento entre el espectro de emisión del donador y el espectro de absorción del aceptor y que se calcula de acuerdo con la ecuación 4.3:

$$J(\lambda) = \frac{\int_{590\text{nm}}^{750\text{nm}} F_D(\lambda) \cdot \varepsilon_A(\lambda) \cdot \lambda^4 \cdot d\lambda}{\int_{590\text{nm}}^{750\text{nm}} F_D(\lambda) \cdot d\lambda} \quad (4.3)$$

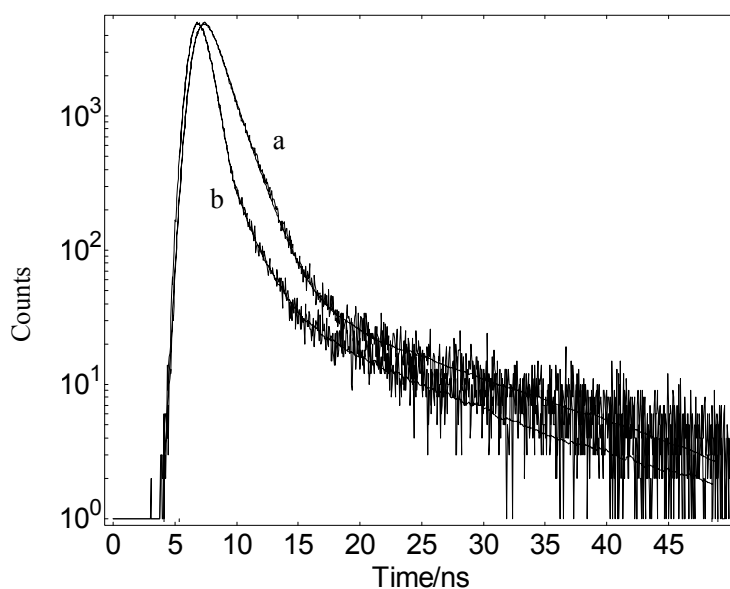


Figura 4.2. Perfiles de decaimiento de tiempo de vida en ausencia (a) y en presencia (b) de cobre. $[Cu(II)] = 1,0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$

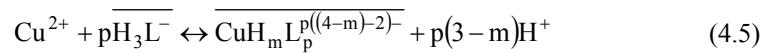
$F_D(\lambda)$ es la intensidad de fluorescencia corregida del donador en el intervalo de longitudes de onda donde tiene lugar el solapamiento utilizando el espectro de emisión normalizado a la unidad y $\varepsilon_A(\lambda)$ es la absorptividad molar del aceptor en la membrana en el intervalo de longitudes de onda del solapamiento. Sustituyendo en la ecuación 4.3 se obtiene un valor para $J(\lambda)$ de $5,76 \cdot 10^{15} \text{ nm}^4 \cdot \text{Kg} \cdot \text{moles}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Para R_0 se obtiene un valor de 47,2

Å, que corresponde a la concentración crítica de aceptor $[A]_{1/2}$ de $7,6 \cdot 10^{-4}$ M calculada de acuerdo con la ecuación 4.4 en la que N es el número de Avogadro.

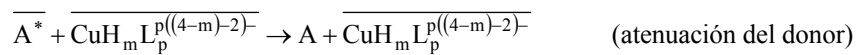
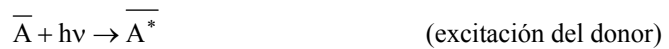
$$R_0 = \left(\frac{3000}{4\pi N [A]_{1/2}} \right)^{1/3} \quad (4.4)$$

La concentración crítica de aceptor se interpreta como la concentración de aceptor necesaria para situar una molécula de aceptor a una distancia R_0 del donador. La distancia de Förster R_0 calculada, interpretada como la distancia entre donador y aceptor a la que se cumple que la eficiencia del proceso RET es del 50%, se encuentra comprendida en el intervalo de valores habituales de este parámetro (20-60 Å). Todo esto nos indica que el proceso de transferencia de energía de resonancia es el proceso dominante en la interacción entre el complejo Zincon-Cu (II) y la TP y que la membrana de PVC proporciona un medio adecuado para llevar a cabo la determinación de Cu (II) en disolución acuosa.

Teniendo en cuenta que el Zincon ($R^+H_3L^-$) sólo reacciona con los iones Cu (II) en membrana, se puede proponer el siguiente equilibrio de reacción:



en el que las especies barradas se encuentran en la membrana y las demás especies se encuentran en disolución acuosa. La sal de catión lipofílico encargada de mantener la electroneutralidad en la membrana no se incluye en la anterior ecuación. Los procesos fotofísicos implicados en el sensor son los siguientes:



La descripción de las características del sensor se hace a través del parámetro de intensidad de fluorescencia relativa α que se define como el cociente entre la concentración de Zincon libre y la concentración total de Zincon en la membrana (C_L). Este parámetro

viene dado por la siguiente expresión que relaciona concentraciones de Zincon e intensidades de fluorescencia de TP teniendo en cuenta el proceso RET:

$$\alpha = \frac{[H_3L^-]}{C_L} = \frac{F - F_0}{F_1 - F_0} \quad (4.6)$$

En esta expresión, F_0 y F_1 son los valores de intensidad de fluorescencia límite del donador TP para $\alpha=0$ (complejación total entre Zincon y Cu (II) y máximo proceso RET) y para $\alpha=1$ (ausencia de Cu (II) y ausencia de proceso RET), respectivamente.

El valor de α se relaciona con la constante de extracción K_e , la concentración analítica del ligando C_L y las actividades de cobre y protones en disolución acuosa a través de la siguiente función respuesta:

$$\frac{\alpha^p}{1 - \alpha} = \frac{a_{H^+}^{p(3-m)}}{p \cdot K_e \cdot C_L^{p-1} \cdot a_{Cu^{2+}}} \quad (4.7)$$

Ajustando el pH con una disolución reguladora adecuada es posible determinar la actividad de cobre en disolución llevando a cabo medidas de intensidad de fluorescencia.

3.2. Optimización de la respuesta del sensor

Los parámetros que hay que tener en cuenta a la hora de optimizar la respuesta del sensor pueden dividirse en dos grupos: 1) parámetros relacionados con la composición de la membrana (proporciones de los componentes del cóctel y condiciones de preparación de la membrana) y 2) parámetros relacionados con el proceso de equilibración entre muestra y sensor (pH, tiempo de contacto y actividad de analito).

3.2.1. Composición de la membrana

La porfirazina TP (Figura 4.3) elegida como donador es soluble en THF y en el polímero de membrana PVC, no así el reactivo Zincon (figura 4.3) que se encuentra en forma de sal sódica.

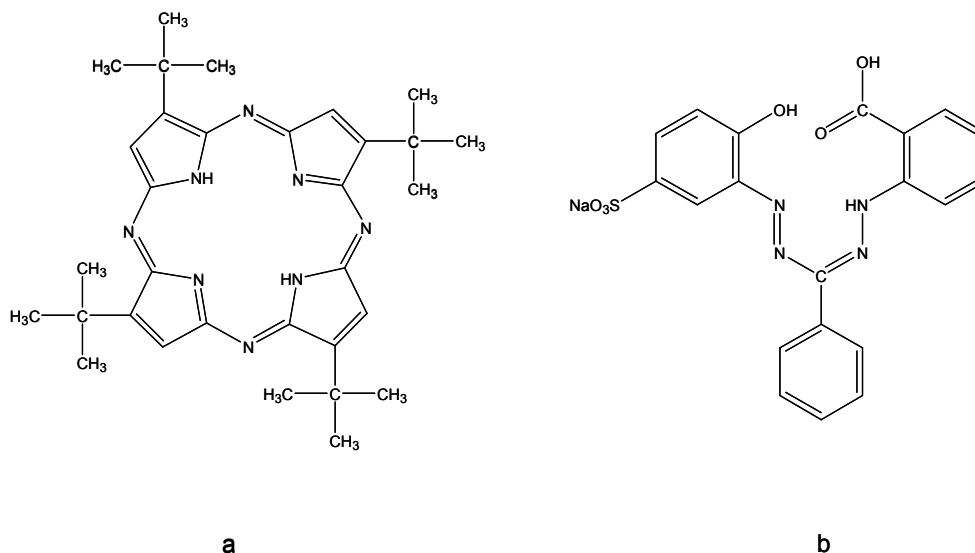


Figura 4.3. Estructura de la 2, 7, 12, 17-tetra-tert-butil-5, 10, 15, 20-tetraaza-21 H, 23 H porfirina (TP) (a) y del 2-carboxi-2'-hidroxi-5'-sulfoformazilbenzeno (Zincon) (b).

Para inmovilizar al Zincon en el interior de la membrana de PVC es necesario formar un par iónico con un contraión lipofílico [37], aunque no es necesario sintetizar el par iónico previamente, basta con añadir la sal lipofílica al cóctel, ya que de esta forma se consigue la disolución total del Zincon. Otra función de la sal lipofílica es mantener a la especie cargada Zincon-Cu (II) en el interior de la membrana sin que lixivie. La sal lipofílica se seleccionó tras ensayar una serie de aminas cuaternarias, tales como: bromuro de tetrabutilamonio (TBAB), cloruro de tridodecilmetilamonio (TDMAC), bromuro de tetradeciltrimetilamonio (TDTMAB), bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HDTMAB) y cloruro de bencetonio (BC). Para llevar a cabo este experimento se preparó una disolución $1,0 \cdot 10^{-5}$ M de Cu (II) a pH 7,0, y se evaluó la respuesta encontrada para las diferentes membranas conteniendo las distintas sales lipofílicas. En el caso de las membranas que contenían TBAB o TDTMAB se observó lixiviación del complejo Zincon-Cu (II) desde la membrana hacia la disolución; las membranas que contenían HDTMAB no lixivaban pero el equilibrio se alcanzaba muy lentamente (30 min); finalmente, las membranas que contenían TDMAC o BC originaban una respuesta intensa a los 10 minutos de reacción sin producir lixiviación. En ambos casos

la respuesta encontrada era muy similar, pero en el caso del BC la zona sensora era más homogénea que en el caso del TDMAC, por lo que BC fue seleccionado como sal lipofílica para formar el par iónico con Zincon y llevar a cabo los demás experimentos.

La influencia de la relación molar Zincon:BC se estudió preparando distintos cócteles con las siguientes relaciones molares: 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6 y 1:10, observándose que para las relaciones 1:1 y 1:2 el complejo azul Zincon-Cu (II) lixiviaba desde la membrana hacia la disolución, mientras que para el resto de relaciones ensayadas se observaba la misma respuesta a cobre. Finalmente se eligió la relación 1:4 como óptima porque era la primera relación que permitía solubilizar al Zincon con facilidad. Estos resultados corroboran que el complejo formado entre Zincon y Cu (II) está cargado negativamente.

Se construyeron diferentes sensores en los que se varió la cantidad de TP entre un 0,3 y un 0,7 %. Los resultados obtenidos (Figura 4.4) muestran que la señal analítica aumenta hasta un 0,5 %, cantidad que fue seleccionada como óptima ya que cantidades superiores a esta originaban atenuación de fluorescencia debido a la alta concentración de especie fluorescente en la membrana.

Se prepararon una serie de membranas con distintas relaciones molares Zincon:TP (0,5:1; 1:1; 2:1 y 4:1) y se evaluó su respuesta frente a Cu (II); la respuesta obtenida para las membranas con relaciones molares 1:1 y 2:1 fue parecida (Figura 4.4), pero la intensidad de fluorescencia inicial decrecía conforme aumentaba la relación molar de acuerdo con la siguiente secuencia 1:0,65:0,46:0,21 debido a la absorción de radiación por parte del Zincon libre. Finalmente, se eligió la relación molar 1:1 como óptima por su mayor intensidad de fluorescencia inicial y por la respuesta analítica proporcionada.

Se probaron distintos plastificantes tales como TBP, TEHP, NPOE, DOS, DOP, y se prepararon membranas con cada uno de ellos, manteniendo una composición fija del resto de los componentes de la membrana. Posteriormente se evaluó su respuesta frente a una disolución $1,0 \cdot 10^{-5}$ M de Cu (II). DOP y DOS no daban respuesta alguna; TEHP daba una respuesta pequeña (10%) pero el proceso era muy lento; TBP (100%) y NPOE (84%) originaban señales altas con menor tiempo de respuesta. Finalmente, TBP fue seleccionado para los siguientes experimentos.

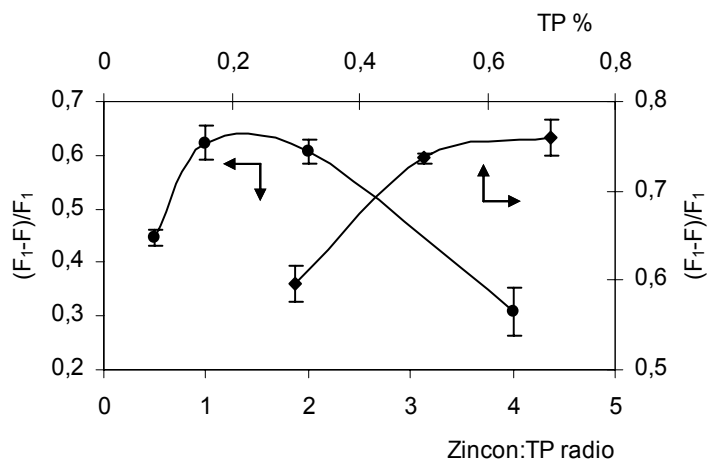


Figura 4.4. Influencia del porcentaje de TP y de la relación molar Zincon:TP en la composición de la membrana.

El estudio de la proporción óptima de plastificante tributilfosfato (TBP) se llevó a cabo observando como se modifican tanto las propiedades físicas de la membrana, como el tiempo de respuesta. El tiempo de respuesta necesario para alcanzar el equilibrio ($t_{95\%}$) se calculó disponiendo las diferentes membranas en la diagonal de una cubeta de cuarzo de 10 mm de espesor llena con una disolución $1,0 \cdot 10^{-5}$ M de Cu (II) registrando la disminución de intensidad de fluorescencia en el tiempo. Los resultados obtenidos fueron: 26 minutos para un 50% de TBP; 14 minutos para un 60%; 13 minutos para un 66%; 17 minutos para un 70% y 18 minutos para un 80%. Para porcentajes mayores al 70% las propiedades físicas de las membranas empeoraban debido a que eran menos homogéneas y el tiempo de secado aumentaba. Un 66% de TBP fue elegido como valor de compromiso.

Las membranas se prepararon depositando un cierto volumen de cóctel sobre el soporte inerte Mylar con la ayuda de un sistema centrífugo de preparación de membranas. De esta forma se obtienen membranas con buenas características ópticas y mecánicas. El volumen de cóctel depositado debe ser tal que se originen membranas de diámetro y espesor adecuados, esto es que el diámetro de la zona sensora sea ligeramente inferior al ancho de la tira de poliéster y superior al haz de radiación del espectrofotómetro de luminiscencia. Se

selecciona finalmente un volumen de 15 μL de cóctel. La reproducibilidad en la preparación de las membranas calculada a partir de los valores de intensidad de fluorescencia inicial fue del 3% ($n=45$).

3.2.2. Parámetros relacionados con el proceso de equilibrio

Los factores relacionados con el proceso de equilibrio son pH, fuerza iónica, tiempo de reacción, volumen de muestra y concentración de cobre. El pH de la disolución no afecta a la intensidad de fluorescencia del donador TP y modifica ligeramente la absorbancia del reactivo Zincon debido a su equilibrio ácido-base en membrana (Figura 4.5). El reactivo Zincon se encuentra formando un par iónico de relación molar 1:1 con el catión amonio cuaternario bencetonio [38]. Cuando se pone en contacto con disoluciones de valores de pH crecientes su absorbancia a 540 nm aumenta, probablemente debido a la disociación del hidrógeno carboxílico (H_2L^{2-}), manteniéndose constante este valor de absorbancia en el rango de pH desde 6 a 9, y decreciendo por encima de pH 9 probablemente debido a la disociación del hidrógeno fenólico (HL^{3-}), desplazándose entonces el máximo de absorción a 510 nm [39]. Estos resultados difieren de los encontrados por Oehme et al. [40] en un estudio previo referido al desarrollo de membranas sensibles a cobre (II) basadas en la inmovilización de Zincon por diferentes métodos, en cuyo caso no encuentran disociación alguna en el rango de valores de pH comprendido entre 2 y 12. Esta diferencia en los resultados encontrados puede atribuirse al hecho de que en nuestro caso tenemos un exceso de cloruro de bencetonio en la membrana, mientras que Oehme et al. utilizan procedimientos que no permiten la presencia de especies disociadas de Zincon en membrana, procedimientos tales como entrapamiento físico del par iónico sintetizado Zincon-tetraoctilamonio o el uso de Zincon sin el grupo sulfónico, inmovilización electrostática de Zincon en una resina intercambiadora de aniones o inmovilización covalente en celulosa.

La reacción entre el sensor desechable propuesto y Cu (II) empieza darse a partir de pH 3, alcanzándose una zona de respuesta constante entre pH 6 y 9, la cual decrece por encima y por debajo de estos valores. El descenso de la señal fluorescente a valores de pH por encima de 9 puede atribuirse a la formación de hidroxocomplejos (Figura 4.6). Los resultados obtenidos son similares a los encontrados por Oehme et al. [37] en su estudio

sobre el desarrollo de una tira reactiva para Cu (II) basada en el uso de Zincon inmovilizado en una membrana de hidrogel. También se estudió la influencia del pH en la reacción entre el sensor propuesto y cinc, encontrándose que dicha reacción tiene lugar a partir de pH 8, hecho similar a lo encontrado en bibliografía [37]; [41]. Para evitar la interferencia debida a cinc se seleccionó el pH de 7 como pH de trabajo. Como disolución reguladora se utilizó un tampón cloruro amónico/amoniaco de pH 7,0 y concentración 0,2 M.

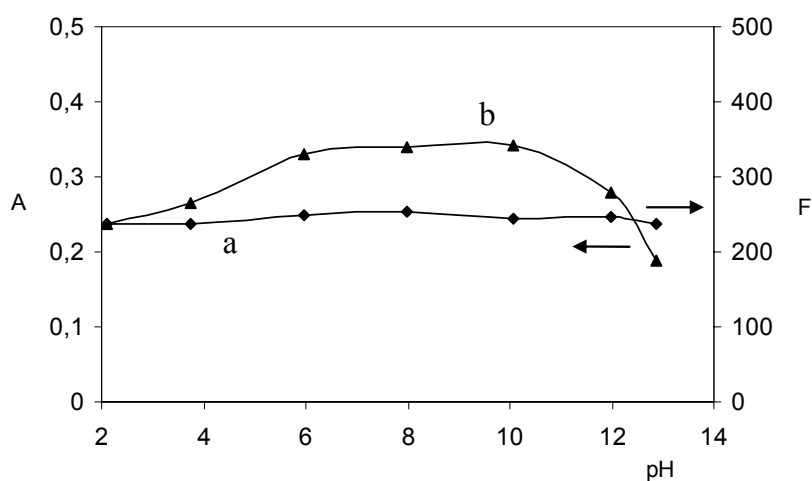


Figura 4.5. Influencia del pH en membranas conteniendo solo TP (a) y en membranas conteniendo solo Zincon (b).

La fuerza iónica apenas influye en la respuesta del sensor, pues aumentando la concentración de NaCl hasta 1,2 M, la señal analítica decrece solo un 2% desde 0,2 a 1,2 M. La influencia del volumen de muestra se estudió probando diferentes volúmenes comprendidos entre 10 y 100 mL (a un nivel de concentración de $5,0 \cdot 10^{-6}$ M de cobre). Se observó un aumento del 30% en la señal analítica cuando aumentaba el volumen desde 10 a 25 mL, y se observó una disminución del 15% cuando se aumentaba desde 25 a 100 mL. Por lo tanto, se eligió un volumen de muestra de 25 mL por la mayor respuesta proporcionada debida al fenómeno de preconcentración y por su mayor reproducibilidad (10 mL, 45% DER; 25 mL, 1,6%; 50 mL, 4,5%; 100 mL 2,7%; n = 3 en todos los casos).

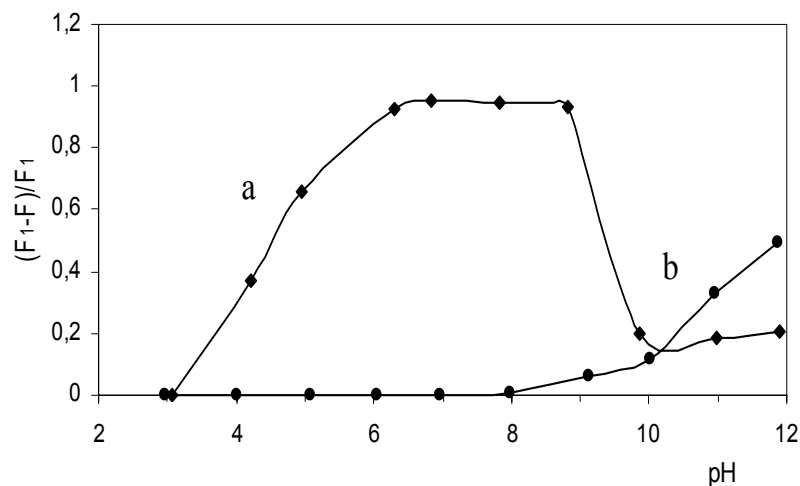


Figura 4.6. Efecto del pH en la respuesta del sensor: a) $1,0 \cdot 10^{-5}$ M Cu(II); b) $1,0 \cdot 10^{-5}$ M Zn(II)

Como la respuesta del sensor desechable propuesto es irreversible debido a la alta constante de estabilidad del complejo Zinco-Cu (II) ($\log K 7,5 \pm 0,1$ en agua [33]), es posible preconcentrar cobre en la zona sensora no solo aumentando el volumen de muestra, sino aumentando el tiempo de contacto entre la disolución problema y la tira reactiva. Se observó que el tiempo de equilibración necesario para el desarrollo de la señal analítica dependía del nivel de concentración de analito presente en la muestra, fenómeno anteriormente observado en otros trabajos basados en reacciones irreversibles [25]; [43]; [42] así como en el sensor desechable estudiado en el capítulo anterior. Por lo tanto, aumentando el tiempo de reacción se podía disminuir el límite de detección. Con objeto de obtener la respuesta analítica en un intervalo de tiempo adecuado, se probó a agitar la disolución para de esta forma eliminar o reducir la etapa de convección difusiva, que es la etapa limitante de la velocidad global del proceso. Se probaron dos tipos de agitación (agitación magnética y vibratoria) encontrándose en ambos casos que 10 minutos eran suficientes para alcanzar la respuesta máxima, pero aplicando agitación vibratoria a 800 oscilaciones por minuto se conseguía una coloración más homogénea de la membrana y por lo tanto se seleccionó esta para llevar a cabo los demás experimentos.

La respuesta de la tira reactiva para actividades comprendidas entre $9,3 \cdot 10^{-12}$ M y $9,2 \cdot 10^{-5}$ M ($1,0 \cdot 10^{-11}$ M y $1,0 \cdot 10^{-4}$ M en concentraciones) a pH 7,0 se muestra en la Figura 4.7, así como el ajuste del modelo teórico propuesto en la ecuación 4.7 a los puntos experimentales. Para la estequiometría del complejo Zincon:cobre se ensayaron valores de $p=1$ y $p=2$, encontrándose que variando el valor de p se variaba la pendiente de la función teórica. Se observa en la Figura 4.7 que suponiendo una estequiometría 1:1 la función teórica se ajusta mejor a los puntos experimentales.

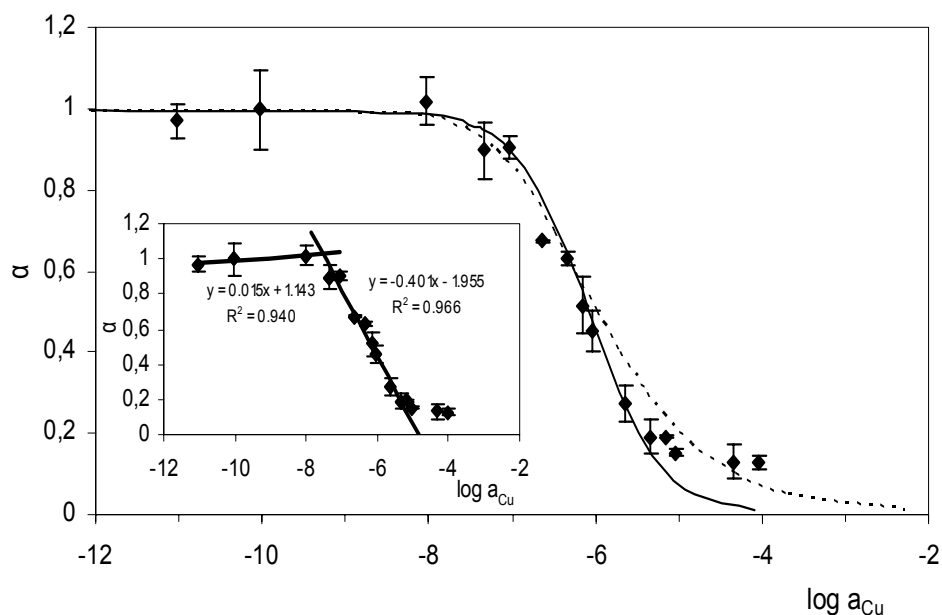


Figura 4.7. Función respuesta. La línea sólida es el modelo teórico suponiendo una estequiometría 1:1 (L:M) y la línea punteada suponiendo una estequiometría 2:1. Gráfico insertado: función de calibrado.

La estequiometría 1:1 sugerida está de acuerdo con lo encontrado en bibliografía para el complejo Zincon:cobre en agua [33]; [32]. Además, se demuestra por experimentos de intercambio iónico que ese complejo en agua está cargado negativamente [41]; [44]; [33], lo que supone una pérdida de los protones carboxílico y fenólico del Zincon y la formación de un complejo con una carga negativa. Nosotros suponemos el mismo comportamiento en la

membrana de PVC, lo que implica un valor de $m=1$ en la ecuación 4.7, lo cual es acorde con los resultados [40] encontrados para membranas de hidrogel y de sol-gel que contienen Zincon sin el grupo sulfónico y que van a originar un complejo neutro con Cu (II) debido a la pérdida de los dos protones anteriormente comentados. El ajuste por mínimos cuadrados de los datos experimentales de la zona de máxima pendiente de la función respuesta (8 niveles de concentración y 3 réplicas de cada uno de ellos) con respecto a la curva teórica, nos permite calcular el valor de $\log K_e=7,9\pm 0,1$. Se observa que para concentraciones altas de cobre los puntos experimentales se alejan del comportamiento teórico, los valores de α son mayores de lo que deberían ser, lo que según la ecuación 4.6 significa que la fracción de Zincon libre es mayor que la predicha por la teoría. Este comportamiento anómalo podría explicarse asumiendo que a altas concentraciones de cobre el reactivo Zincon debe estar totalmente complejado y el proceso RET debe ser máximo, ya que la relación molar Zincon:TP es 1:1, pero que la eficiencia del proceso estimada a partir de los tiempos de vida del donador en ausencia y en presencia del aceptor no es muy alta (0,58). Esto justificaría la existencia de un valor de fluorescencia de fondo que daría lugar a valores de α mayores de los esperados.

3.3. Parámetros analíticos

Para caracterizar el sensor propuesto, hemos utilizado un ajuste a un modelo lineal en la zona central de la función sigmoideal aplicando un test de fallo de ajuste, y calculando el límite de detección como la intersección entre esta función lineal y una función lineal ajustada en la zona de mínima pendiente [28]. Para definir el rango de medida se prepararon dos series de patrones, una serie en la zona de máxima pendiente formada por ocho estándares y tres réplicas de cada uno, utilizando una tira diferente para cada una de las réplicas; entre $4,6\cdot 10^{-8}$ y $4,6\cdot 10^{-6}$ en actividades ($5,0\cdot 10^{-8}$ y $5,0\cdot 10^{-6}$ M in concentraciones); la otra serie se establece en la zona de mínima pendiente de valores de actividad bajos y está formada por 3 estándares y 3 réplicas de cada uno, utilizando otra vez tiras reactivas diferentes para cada una de las réplicas; entre $9,3\cdot 10^{-12}$ y $9,3\cdot 10^{-9}$ en actividades ($1,0\cdot 10^{-11}$ y $1,0\cdot 10^{-8}$ M in concentraciones). La linealidad de cada serie se prueba aplicando un test de fallo de ajuste obteniéndose las siguientes funciones lineales: 1) en la zona de máxima

pendiente: $\alpha = -1,955 - 0,401 \log a_{\text{Cu}^{2+}}$; 2) en la zona de mínima pendiente: $\alpha = 1,143 - 0,015 \log a_{\text{Cu}^{2+}}$. El límite de detección se calcula de la intersección de ambas funciones, obteniéndose un límite de detección de $0,039 \mu\text{M}$ ($2,5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) (en concentración).

El límite superior, que viene definido por el punto de corte entre la función lineal de máxima pendiente y el eje de abscisas, muestra un valor de $14 \mu\text{M}$. Por ello, el rango de medida estaría comprendido entre $0,039$ y $14 \mu\text{M}$ (en concentraciones).

Para evaluar la precisión del procedimiento propuesto (expresada como la desviación estándar relativa) se realizó un estudio a tres niveles de actividad de Cu (II) comprendidos dentro del rango dinámico lineal, $0,093 \mu\text{M}$, $1,9 \mu\text{M}$ y $3,7 \mu\text{M}$ en actividades ($0,1$, $2,0$ y $4,0 \mu\text{M}$ en concentraciones) y $n= 8$, utilizando una tira reactiva diferente para cada una de las réplicas. Los valores de DER obtenidos fueron $2,5$, $1,9$ y $1,7$ % expresados en términos de $\log a_{\text{Cu}^{2+}}$. El sensor no puede ser reutilizado debido a su carácter irreversible. Para determinar la estabilidad del sensor propuesto se preparó un conjunto de tiras reactiva, que fueron adecuadamente almacenadas protegiéndolas de la luz y de la humedad excesiva, y se evaluó su respuesta en el tiempo para una concentración de Cu (II) situada en la mitad del rango dinámico lineal, de esta forma se comprobó que las tiras eran estables al menos durante 1 mes. La Tabla 4.1 nos muestra éstos y otros parámetros analíticos.

Con el fin de examinar los efectos producidos por posibles especies interferentes en la respuesta del sensor se escogió una concentración $1 \mu\text{M}$ de Cu (II) y se probaron una serie de iones metálicos a tres niveles de concentración diferentes: 1 , 10 y $50 \mu\text{M}$. Para el estudio de cada uno de ellos se prepararon seis membranas, tres de las cuales se hacían reaccionar con la disolución que contenía solamente Cu (II) y las otras tres se hacían reaccionar con la disolución conteniendo además de cobre la especie interferente, posteriormente los resultados obtenidos se comparaban estadísticamente (P-value). De todas las especies estudiadas (Zn (II), Ni (II), Fe (III), Cd (II), Hg (II), Mn (II), y Pb (II)) solo Zn (II) producía interferencia cuando su concentración era 50 veces superior a la de cobre. También se estudió la posible interferencia debida a Ca (II) a un nivel de concentración de $3000 \mu\text{M}$ y debida a Mg (II) a un nivel de concentración de $1740 \mu\text{M}$, así como la originada por una mezcla de cloruro, sulfato y nitrato a un nivel de concentración de $1000 \mu\text{M}$ cada uno, no

encontrándose interferencia en ninguno de los casos. Es importante destacar que el anión cloruro no origina interferencia a niveles de concentración de hasta 1,2 M, lo que nos permitiría utilizar el sensor en el análisis de muestras con alto contenido salino.

Tabla 4.1. Parámetros analíticos.

Parámetro	Valor, S
Ordenada en el origen	-1,955; 0,103
Pendiente	-0,401; 0,016
Nivel de probabilidad % (lack-of-fit test)	10,74
Límite inferior (μM)	0,039
Rango lineal (μM)	0,039 – 14
DER (%) ^a	2,5 (0,093 μM^{b}) 1,9 (1,9 μM^{b}) 1,7 (3,7 μM^{b})
Tiempo de respuesta	10 min
Tiempo de vida	1 mes
Coste	0,003 €/tira

a: DER en términos de $\log a_{\text{Cu}^{2+}}$, b: actividades

Las características analíticas del sensor propuesto son mejores que las de otros sensores que utilizan el mismo u otros reactivos cromogénicos [2]. Por ejemplo, la determinación de Cu (II) en flujo utilizando una membrana de hidrogel conteniendo Zincon inmovilizado trabaja en un rango de concentraciones comprendido entre 1 y 100 μM [37]. Comparando nuestro procedimiento con otros procedimientos también basados en RET, encontramos un límite de detección de 12,9 μM de Cu (II) para un método en disolución basado en el uso de Fluorescence Red, Eosin Y y 1,10 fenantrolina [45]. Se ha comprobado que con el uso de membranas sensoras se puede mejorar el límite de detección, como es el caso del sensor propuesto por Rolinski et al. basado en el uso de Rojo de Texas X y N,N,N',N'-tetrametililenodiamina inmovilizados en Nafion, con el que se alcanza un límite de detección de 0,031 μM de Cu (II) [46] o el caso de un sensor basado en el uso de

batocuproina y perileno inmovilizados en Nafion o en resina Amberlita para la determinación de Cu (I) y que alcanza un límite de detección de 0,002 μM [18]. Sin embargo, en ninguno de los ejemplos comentados se desarrolla el procedimiento analítico.

3.4. Aplicaciones y validación

La aplicabilidad del método propuesto fue ensayada para diferentes tipos de muestras de agua de diversa procedencia (río, manantial, pozo, piscina y urbana procedente de casas con tuberías de cobre antiguas). En la Tabla 4.2 observamos los resultados obtenidos por el procedimiento propuesto y por el de referencia, que es el de espectroscopia de absorción atómica. Los valores reflejados en dicha tabla corresponden a la media de tres réplicas de cada muestra para cada uno de los métodos. También está incluida la desviación estándar de estas réplicas así como el valor P del test de comparación de medias, que nos indica que en ningún caso existe diferencia significativa entre los resultados obtenidos mediante el sensor desechable desarrollado y los obtenidos mediante el método de referencia, pues siempre el valor $P_{\text{value}} > 5\%$.

Tabla 4.2. Determinación de cobre en diferentes tipos de agua usando AAS como método de referencia

Muestra	Tira reactiva ($\mu\text{M Cu}$)	S	AAS ($\mu\text{M Cu}$)	S	P_{val} (%)
Agua de manantial (<i>La Peza, Granada</i>)	0,6	0,15	0,746	0,009	12,79
Agua urbana (Ogijares, Granada)	0,8	0,18	1,009	0,003	9,12
Agua urbana (San José, Almería)	0,8	0,10	0,913	0,003	19,45
Agua de pozo (Otura, Granada)	1,0	0,35	1,138	0,006	46,04
Agua de pozo (La Línea, Cádiz)	1,0	0,23	1,111	0,003	34,84
Agua de piscina (Peligros, Granada)	0,6	0,14	0,72	0,010	12,06
Agua de río (Granada)	2,0	0,17	1,938	0,003	59,11

4. Conclusiones

Hemos desarrollado una tira reactiva para la determinación de Cu (II) en agua a pH neutro basada en el uso de transferencia de energía de resonancia. La membrana sensora se construye fácilmente por inmovilización del donador fluorescente 2,7,12,17-tetra-tert-butil-5,10,15,20-tetraaza-21H,23H-porfirina y del reactivo cromogénico convencional Zincon en una membrana de PVC. El reactivo Zincon se encuentra formando un par iónico con el catión bencetonio. Tras seleccionar el reactivo cromogénico adecuado para Cu (II), el donador fluorescente, la composición de la membrana y las condiciones de reacción, construimos un sensor óptico de un solo uso más sensible y selectivo que otros optodos propuestos para la determinación de cobre. El tiempo de respuesta no es muy alto, siendo de 10 minutos aplicando agitación y de 13 minutos sin agitar. El sensor origina una respuesta irreversible que puede ser evaluada mediante el uso de un fluorímetro convencional. Todos los reactivos necesarios para la determinación de cobre están contenidos en la zona sensora, lo que implica que solo será necesario tamponar la muestra a analizar. La tira reactiva aquí propuesta ofrece buenos resultados en términos de exactitud, precisión y coste, lo que la hace apta para llevar a cabo análisis rutinarios.

Agradecimientos

Agradecemos la financiación al Ministerio de Educación y Cultura, Dirección General de Enseñanza Superior (Proyecto N° BQU2002-00353).

Bibliografía

- [1] Y. Zolotov, V. M. Ivanov, V. G. Amelin, *Chemical test methods of analysis*, Elsevier, Amsterdam, 2002.
- [2] I. Oehme O. S. Wolfbeis, *Mikrochim.Acta* 126 (1997) 177.
- [3] L. F. Capitán-Vallvey, M. D. Fernández-Ramos, Solid-phase spectrometric assays, in S. Alegret, Ed. *Integrated Analytical Systems*, Elsevier Science B.V, Amsterdam, 2003, p. 81.
- [4] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer, 1999.
- [5] A. S. Holmes, M. Lopez, O. J. Rolinski, D. J. S. Birch y M. Darbyshire, *SPIE* 2388 (1995) 171.
- [6] R. H. Yang, K. M. Wang, D. Xiao y X. Hai Yang, *Analyst* 125 (2000) 1441.
- [7] C. Huber, T. Werner, C. Krause, I. Klimant y O. S. Wolfbeis, *Anal.Chim.Acta* 364 (1998) 143.
- [8] R. Pohl, D. Aldakov, P. Kubat, K. Jursikova, M. Marquez y P. Anzenbacher, Jr., *Chem.Comm.* (2004) 1282.
- [9] R. Ni, R. B. Tong, C. C. Guo, G. L. Shen y R.O. Yu, *Talanta* 63 (2004) 251.
- [10] Y. Amao, N. Nakamura, *Sensors Act.B* 100 (2004) 351.
- [11] Q. Chang, J.Sipior, J. R. Lakowicz, y G. Rao, *Anal.Biochem.* 232 (1995) 92.
- [12] O. J. Rolinski, D. J. S. Birch, L. McCartney, y J. C. Pickup, *Spectrochim.Acta A* 57A (2001) 2245.
- [13] A. S. Steven, *Curr.Op.Biotech.* 11 (2000) 47.
- [14] A. Kashiwada, Y. Nakamura, y K. Matsuda, *Sensors Act.B*, in Press (2005).

-
- [15] D. J. S. Birch, A. S. Holmes y M. Darbyshire, *Meas.Sci.Technol.* 6 (1995) 243.
- [16] O. J. Rolinski, D.A. Hatrick, A.Volkmer y D. J. S. Birch, *J.Fluor.* 7 (1997) 207S.
- [17] O.J. Rolinski, I.R. Downie, A.S. Holmes, D.J.S. Birch, *Proc.SPIE* 2388 (1995) 290.
- [18] O.J. Rolinski, D.J.S. Birch, *Meas.Sci.Technol.* 10 (1999) 127.
- [19] J. Díaz-García, J.M. Costa-Fernández, N. Bordel, R. Pereiro-García, A. Sanz-Medel, *Anal.Chim.Acta* 486 (2003) 1.
- [20] C. Krause, T. Werner, C. Huber, I. Klimant, O.S. Wolfbeis, *Anal.Chem.* 70 (1998) 3983.
- [21] R.B. Thompson, Z. Ge, M. Patchan, C.C. Huang, C.A. Fierke, *Biosensors Bioelectron.* 11 (1996) 557.
- [22] M. Arduini, F. Felluga, F. Mancin, P. Rossi, P. Tecilla, U. Tonellato, N. Valentinuzzi, *Chem.Comm.* 2003 (2003) 1606.
- [23] T. Jin, *Chem.Comm.* (1999) 2491.
- [24] L.F. Capitán-Vallvey, P. Alvarez de Cienfuegos, M.D. Fernández-Ramos, R. Avidad-Castañeda, *Sensors Act.B* 71 (2000) 140.
- [25] L.F. Capitán-Vallvey, O.M.A. Al-Barbarawi, M.D. Fernández-Ramos, R. Avidad-Castañeda, V. Ramirez Gonzalez, *Analyst* 125 (2000) 2000.
- [26] K. Seiler, W. Simon, *Anal.Chim.Acta* 266 (1992) 73.
- [27] P.C. Meier, *Anal.Chim.Acta* 136 (1982) 363.
- [28] L.F. Capitán-Vallvey, M.D. Fernández-Ramos, P. Alvarez de Cienfuegos, *Anal.Chim.Acta* 451 (2002) 231.
- [29] H. Du, R.C.A. Fuh, J. Li, L.A. Corkan, J.S. Lindsey, *Photochem.Photobiol.* 68 (1998) 141.
- [30] E. Bakker, P. Bühlmann, E. Pretsch, *Chemical Rev.* 97 (1997) 3083.
- [31] T. Förster, *Ann.Chim.* 2 (1948) 55.

-
- [32] R.M. Rush, J.H. Yoe, *Anal.Chem.* 26 (1954) 1345.
- [33] M.A. Dosal Gomez, J.A. Perez-Bustamante, F. Burriel-Marti, *Anal.Quim.* 70 (1974) 515.
- [34] K.L. Cheng, K. Ueno, T. Imamura, *Handbook of Organic Analytical Reagents*, CRC Press, Boca Raton, Florida, US, 1982.
- [35] N. Kobayashi, S.i. Nakajima, H. Ogata, T. Fukuda, *Chem.Eur.J.* 10 (2004) 6294.
- [36] D. Pop, B. Winter, W. Freyer, I.V. Hertel, W. Widdra, *J.Phys.Chem.B* 107 (2003) 11643.
- [37] I. Oehme, B. Prokes, I. Murkovic, I. Werner, I. Klimant, O.S. Wolfbeis, *Fresenius J.Anal.Chem.* 350 (1994) 563.
- [38] A.K. Trofimchuk, Y. Tarasova, *J.Anal.Chem.* 59 (2004) 114.
- [39] F.S. Sadek, R.W. Schmid, C.N. Reilley, *Talanta* 2 (1959) 38.
- [40] I. Oehme, S. Prattes, O.S. Wolfbeis, G.J. Mohr, *Talanta* 47 (1998) 595.
- [41] R.M. Liu, D.J. Liu, A.L. Sun, *Talanta* 40 (1993) 381.
- [42] L.F. Capitán-Vallvey, E. Arroyo, C. Berenguer, M.D. Fernández-Ramos, R. Avidad-Castañeda, *Fresenius J.Anal.Chem.* 369 (2001) 144.
- [43] L.F. Capitán-Vallvey, M.D. Fernández-Ramos, R. Avidad-Castañeda, M. Deheid, *Anal.Chim.Acta* 440 (2001) 131.
- [44] P. Richter, M.I. Toral, H. Castro, *Anal.Lett.* 35 (2002) 635.
- [45] M. Hou, J. Zhang, *Fenxi Kexue Xuebao* 20 (2004) 619.
- [46] Rolinski, O. J.; Birch, D. J. S., (1997) .

CAPÍTULO 5
DETERMINACIÓN DE MERCURIO
EN AGUA MEDIANTE UN SENSOR
ÓPTICO IRREVERSIBLE BASADO
EN EL USO DE UN IONÓFORO
NEUTRO

DETERMINACIÓN DE MERCURIO EN AGUA MEDIANTE UN SENSOR ÓPTICO IRREVERSIBLE BASADO EN EL USO DE UN IONÓFORO NEUTRO

Resumen

En este capítulo se describe el desarrollo de una tira reactiva para determinar mercurio en agua. Esta tira reactiva está formada por una zona sensora circular que contiene todos los reactivos necesarios para proporcionar una respuesta selectiva a mercurio, su componente principal es un polímero formador de membrana (PVC) que va a contener al ionóforo neutro selectivo a cationes 1,4,7,10-tetraazaciclododecano, al cromoionóforo 9-dimetilamino-5-[4-(15-butil-1,13-dioxo-2,14-dioxanonadecil)fenilimino]benzo[a]fenoxazina y a la sal lipofílica tetrafenilborato de tetrabutilamonio. El sensor se basa en un mecanismo de intercambio iónico. Cuando éste se introduce en una disolución que contenga mercurio a pH 4,7 durante un tiempo determinado que va a depender de la concentración de mercurio presente en la disolución, tendrá lugar un cambio de color de la zona sensora de azul a rojo, que nos permite utilizar el valor de absorbancia de la tira reactiva a 670 nm como señal analítica. Se estudiaron todas las variables experimentales que influían en la respuesta de la tira reactiva, especialmente en términos de selectividad y tiempo de respuesta. El sensor responde linealmente a mercurio en el rango de concentraciones que va desde 0,3 a 5,1 μM , presentando un valor de reproducibilidad del 1,6% expresado como desviación estándar relativa (DER) para una concentración intermedia en el rango dinámico lineal y un tiempo de agitación de 60 minutos. Del mismo modo, responde linealmente a un rango de concentraciones comprendido entre 7,9 y 108 μM de Hg(II) con una DER del 1,8% para una concentración intermedia en este rango y un tiempo de reacción de 5 minutos sin agitación. El procedimiento fue aplicado a diferentes tipos de agua (urbanas, minerales y naturales), y los resultados obtenidos fueron contrastados con un método de referencia.

1. Introducción

La determinación de metales pesados en cantidades traza tiene especial importancia en campos como la medicina, la biología, el medioambiente y el control de procesos. El mercurio es un elemento particularmente tóxico, de gran interés medioambiental ya que se encuentra presente en la litosfera y en el agua [1,2]. En las últimas décadas se han hecho progresos considerables en la metodología analítica utilizada para la determinación de mercurio, destacando el uso de la absorción atómica o espectrometría de emisión, la espectrometría de masas y la voltamperometría. Para el análisis de niveles traza de las diferentes especies de mercurio, se han utilizado sobre todo métodos cromatográficos con detectores espectrométricos [3,4]. Aunque estos métodos son sensibles y precisos, la mayoría de ellos requieren un pretratamiento de la muestra tedioso y sofisticado haciendo necesario el uso de equipamiento caro para llevarlo a cabo; además, ninguno de ellos puede utilizarse para realizar análisis in-situ en aquellos lugares donde se precise la información analítica.

Actualmente, existe un gran interés por desarrollar sistemas rápidos de análisis. Entre estos sistemas cabe destacar el desarrollo de tiras reactivas basadas en la llamada “química seca”, las cuales han sido ampliamente utilizadas en análisis clínicos [5-7]. Las tiras reactivas pueden describirse como sistemas integrales de análisis que van a contener todos los reactivos necesarios para realizar el análisis, distribuidos uniformemente en forma seca dentro de almohadillas o de películas [8] y con esas zonas reactivas adheridas a la parte inferior de pequeñas tiras de plástico. Para utilizar estos sistemas, la zona sensora de la tira reactiva se pone en contacto con la disolución problema, ya sea por adición de un pequeño volumen de la disolución problema sobre la zona sensora o bien, por introducción de la tira reactiva en un cierto volumen de la mencionada disolución. Una vez llevada a cabo la reacción, se mide una propiedad óptica (absorbancia [9], reflectancia difusa [10], luminiscencia [11]) o electroquímica [12] del derivado originado sobre el propio dispositivo.

A la hora de desarrollar sensores ópticos para determinar mercurio se han seguido diferentes estrategias, de las cuales podemos destacar la basada en la inhibición provocada por el mercurio sobre la enzima ureasa y la medida del tiempo transcurrido hasta la desaparición del color de un indicador de pH presente; este sensor se ha utilizado para determinar mercurio en agua y presenta un límite de detección de $0,2 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ [10]; otra

estrategia se basa en el uso de reactivos convencionales como por ejemplo la tirodina, un análogo de la rodanina, retenida en una membrana de policaproamida, utilizada para determinar mercurio en muestras de origen industrial con límites de detección de hasta $5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ [13].

La tira reactiva desarrollada en este capítulo se basa en el uso de sistemas ionóforo-cromoionóforo, que ha sido ampliamente utilizado en el desarrollo de tiras reactivas para la determinación rápida de iones, fundamentalmente alcalinos y alcalinotérreos en muestras de origen clínico. El método más comúnmente utilizado se basa en el intercambio iónico entre la fase hidrófoba y la disolución acuosa. La fase hidrófoba va a contener al ionóforo neutro, habitualmente un coronano, criptandano o podano, capaz de enlazar al ión metálico desde la disolución acuosa, y un cromioionóforo selectivo de protones que cambia su color o su fluorescencia como consecuencia de la pérdida de protones debida a la entrada del ión metálico en la membrana hidrófoba. La magnitud del cambio producido en la correspondiente señal óptica es proporcional a la concentración de ión metálico en la disolución [14].

Este tipo de tiras reactivas se han llevado a la práctica en dos tipos de formatos diferentes: monocapa y multicapa. Los formatos monocapa se pueden clasificar en membranas homogéneas [15,16] y membranas heterogéneas. En este último caso, la tira reactiva está compartimentalizada para separar etapas secuenciales particulares de la reacción analítica global, con el objeto principalmente de reducir el tiempo de reacción. Existen diferentes enfoques: a) partículas sólidas impregnadas [17-19]; b) uso de una matriz porosa impregnada con una fase hidrófoba conteniendo el plastificante, ionóforo y cromioionóforo [20,21]; c) el uso de emulsiones en ambas fases, en las que un polímero hidrofílico conteniendo un tampón se distribuye en un polímero hidrofóbico formador de membrana que contiene los reactivos restantes [22].

En este capítulo, estudiamos el desarrollo de una nueva tira reactiva para determinar mercurio basada en una membrana homogénea que contiene todos los reactivos necesarios para responder a mercurio de forma selectiva y cuantitativa a través de la modificación del color de la zona sensora. La tira reactiva propuesta para mercurio se basa en el empleo de un ionóforo y un cromioionóforo y funciona mediante un mecanismo de intercambio iónico de

tipo irreversible. Se han estudiado distintos ionóforos, seleccionando finalmente el 1,4,7,10-tetraazaciclododecano porque es suficientemente selectivo para la aplicación pretendida, la determinación de mercurio en aguas.

2. Esquema de sensado

Como hemos comentado anteriormente el sensor propuesto en este capítulo se basa en un mecanismo de intercambio iónico entre la disolución acuosa y la membrana sensora. La membrana contiene un ionóforo L y un cromoióforo C ambos neutros, y además requiere de la presencia de aniones lipofílicos R^- que proporcionan a la membrana propiedades de cambio iónico (Figura 5.1).

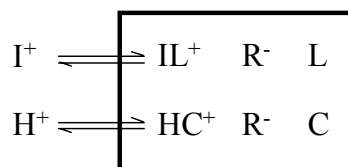
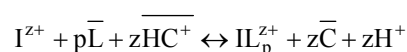


Figura 5.1. Esquema general de sensado para cationes por intercambio iónico.

El equilibrio global que tiene lugar entre la muestra y la tira reactiva será:



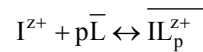
en el que no se han incluido los aniones lipofílicos ya que no intervienen en el intercambio de cargas, solo lo permiten. Ese equilibrio viene gobernado por la constante $K_e^{IL_p}$

$$K_e^{IL_p} = \frac{a_{H^+}^z [C]^z [IL_p^{z+}]}{a_{I^{z+}} [HC^+] [L]^p} \quad (5.1)$$

En ella las concentraciones en fase orgánica vienen dadas en molalidades ($\text{moles} \cdot \text{kg}^{-1}$) y sus coeficientes de actividad se denotan por γ . En fase acuosa las actividades se denotan por a .

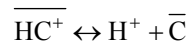
Esta constante $K_e^{II_p}$ será función de la constante de complejación, de la constante de acidez del cromoióforo y de las lipofilidades relativas del analito $K_{I^{z+}}$ y del protón K_{H^+} .

La constante de complejación se refiere al equilibrio:



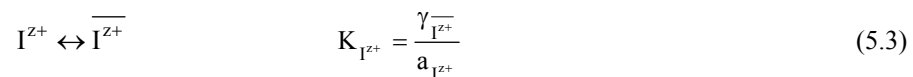
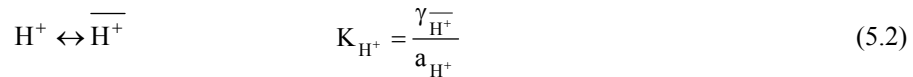
y viene dada por $\beta_{IL_p^{z+}} = \frac{a_{IL_p^{z+}}}{a_{I^{z+}} a_L^p}$.

La constante de acidez del cromoióforo, por su parte, responde al equilibrio:



y viene dada por $K_a = \frac{a_{H^+} a_C}{a_{HC^+}}$.

Las lipofilidades relativas del analito $K_{I^{z+}}$ y del protón K_{H^+} se pueden describir mediante a los equilibrios:



Si sustituimos actividades por las correspondientes concentraciones y coeficientes de actividad en las cuatro constantes que acabamos de definir y, a su vez, operamos en la $K_e^{II_p}$ (ec. 5.1) resulta que la constante de intercambio se relaciona con las constantes de formación del complejo, de acidez del cromoióforo y las lipofilidades de los iones principal y de referencia, así como con los coeficientes de actividad en fase membrana, según:

$$K_e^{II_p} = \frac{K_{I^{z+}} \beta_{II_p^{z+}} K_a^z}{K_{H^+}^z} \left(\frac{\gamma_{HC^+}}{\gamma_C} \right)^z \frac{(\gamma_L)^z}{\gamma_{II_p^{z+}}} \quad (5.4)$$

Como vemos las actividades de todas las especies involucradas controlan el equilibrio, pero solo la concentración del cromoióforo será accesible a través de medidas ópticas. En consecuencia, es esencial que los coeficientes de actividad permanezcan constantes en todo el rango de medida. Para una membrana dada del tipo que estamos considerando, la fuerza iónica dentro de ella se mantiene virtualmente constante, pues está definida por la concentración de sal lipofílica, lo que, de acuerdo con la teoría de Debye-Hückel, debe originar un coeficiente de actividad medio constante en fase membrana. En una primera aproximación, los coeficientes de actividad de las especies cargadas serán despreciables y el cambio en los coeficientes de actividad de las especies neutras se supone que será relativamente pequeño dentro del rango de calibración, si su concentración total se mantiene baja. Cuando la cantidad de alguno se incrementa, así de ionóforo por razones de selectividad, se observa un cambio en el coeficiente de actividad y, por tanto, en la constante de equilibrio $K_e^{II_p}$ [23]. Eso significa que las concentraciones en fase orgánica son proporcionales a las actividades. En resumen, la expresión anterior queda reducida a:

$$K_e^{II_p} = \frac{K_{I^{z+}} \beta_{II_p^{z+}} K_a^z}{K_{H^+}^z} \quad (5.5)$$

Para expresar la constante de equilibrio $K_e^{II_p}$ en función de parámetros experimentales, realizaremos un balance de cargas en la membrana, llamando C_R a la concentración analítica de anión lipofílico:

$$C_R = [HC^+] + z [II_p^{z+}] \quad (5.6)$$

y los correspondientes balances de masas respecto a ionóforo (C_L concentración analítica de ionóforo) y cromoióforo (C_C concentración analítica de cromoióforo):

$$C_L = [L] + p [II_p^{z+}] \quad (5.7)$$

$$C_C = [C] + [HC^+] \quad (5.8)$$

Así mismo, definiremos la fracción de cromoióforo α como el cociente de forma no protonada a total:

$$[C] = \alpha C_C \quad (5.9)$$

luego

$$[HC^+] = (1 - \alpha)C_C \quad (5.10)$$

Como el cromoióforo es la única especie detectable en la membrana, si medimos a una longitud de onda característica de la especie desprotonada, podemos definir una absorbancia normalizada, que será la misma fracción α anterior, como parámetro analítico, de manera que si $\alpha = 1$ no habrá cromoióforo protonado y le corresponderá una absorbancia A_1 y si $\alpha = 0$ todo el cromoióforo estará protonado y su absorbancia correspondiente será A_0 . La forma habitual de establecer A_1 consiste en tratar la membrana con una disolución 0,1 M de NaOH lo que obliga a que todo el cromoióforo esté en forma básica. En el caso de A_0 se trata con HCl 0,1 M con lo que el cromoióforo se encontrará en forma ácida.

Sustituyendo resulta:

$$\alpha = \frac{[C]}{[C_C]} = \frac{A_0 - A}{A_0 - A_1} \quad (5.11)$$

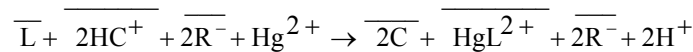
Si combinamos las ecuaciones 5.5, 5.6, 5.7, 5.8 y 5.11 obtendremos la función respuesta de la membrana sensora para el ión I^{z+} :

$$K_e^{II_p} = \frac{1}{a_{I^{z+}}} \left(\frac{a_{H^+} \alpha}{1 - \alpha} \right)^z \frac{C_R - (1 - \alpha)C_C}{z \left(C_L - \frac{p}{z} (C_R - (1 - \alpha)C_C) \right)^p} \quad (5.12)$$

$$a_{I^{z+}} = \frac{1}{K_e^{1/p}} \left(\frac{a_{H^+} \alpha}{1-\alpha} \right)^z \frac{C_R - (1-\alpha)C_C}{z \left(C_L - \frac{p}{z} (C_R - (1-\alpha)C_C) \right)^p} \quad (5.13)$$

Dado que la membrana sensora está en equilibrio químico con la muestra conteniendo analito, lo que mediremos no serán concentraciones, sino el cociente de actividades entre el ión de referencia y el analito. Si se mantiene constante la actividad del ión de referencia podemos despejar la actividad del analito (ec. 5.13).

En este caso concreto, cuando una disolución conteniendo mercurio se pone en contacto con la tira reactiva, tiene lugar la siguiente reacción de intercambio iónico caracterizada por una constante K_e y suponiendo una estequiometría 1:1 para el complejo ionóforo-Hg (II):



La ecuación general 5.13 queda reducida en esta ocasión a:

$$a_{I^{z+}} = \left(\frac{a_{H^+} \alpha}{1-\alpha} \right)^z \frac{K_e^{1/z} [(C_R - (1-\alpha)C_C)]}{\left[C_L - \frac{p}{z} (C_R - (1-\alpha)C_C) \right]^p} \quad (5.14)$$

En nuestro caso, la reacción con el ión Hg (II) está muy desplazada hacia la derecha y se puede considerar irreversible, pero la forma de la función respuesta coincide con la ecuación 5.13 utilizando concentraciones en vez de actividades y datos experimentales para z y p . Por esta razón, usaremos esta función para propósitos de calibración pero no para explicar el modelo teórico.

Para calcular el valor de la constante K_e necesario para obtener el ajuste óptimo de los datos experimentales se siguió el procedimiento descrito en la referencia [16], según el cual se toman valores en la zona de máxima pendiente de la función de calibrado para un determinado tiempo de equilibración.

3. Experimental

3.1. Instrumentación y software

Para realizar las medidas de absorbancia se utilizó un espectrofotómetro Hewlett-Packard HP-8453 de diodos en fila conectado a un ordenador personal Pentium MMX 200. La recogida y tratamiento de los espectros UV-Vis fue llevada a cabo utilizando el software UV HP ChemStation Software (modo de cinética incluido) proporcionado por HP. Las medidas de absorbancia se realizaron utilizando el soporte anteriormente descrito en el capítulo de Bases Físico-Químicas, de 44 mm de altura y 12 mm² de base construido en un bloque de hierro pintado de negro. El diámetro del orificio de medida es de 5 mm y se sitúa a 11,5 mm de la base. El soporte presenta una rendija de 1 mm de espesor, donde se introduce la tira reactiva para su medida [24].

Se utilizaron también otros aparatos y material de laboratorio tales como: un sistema rotatorio de velocidad de giro variable para la preparación de las membranas [25], una micropipeta de 50 µL de la casa comercial Brand GmbH (Wertheim/Main, Alemania), un pH-metro digital provisto de electrodo combinado de vidrio y cloruro de plata (Crison, Barcelona, España), un baño de ultrasonidos de la casa Branson y un agitador de tubos Vibromatic (Selecta, Barcelona, España).

Los programas utilizados para las representaciones gráficas y el tratamiento de datos fueron: Statgraphics Plus Versión 6.0, STSC. Inc., de Statistical Graphics Corp., USA, 1993 y GraphMatica para Win32 v1.60d, 1998 editado por K. Hertzler y adaptado por J. Garrido.

3.2. Reactivos y materiales

La disolución madre de mercurio (10^{-4} M) se preparó por pesada exacta de nitrato de mercurio monohidratado (Probus, Barcelona) y posterior disolución con una disolución reguladora 0,01 M ácido acético/acetato potásico de pH 4,7. Las disoluciones más diluidas se prepararon a partir de la disolución madre diluyendo ésta con la misma disolución reguladora. También se prepararon disoluciones madre de otros iones metálicos: Pb (II) 0,1 M preparada a partir del correspondiente nitrato (Probus), Fe (III) $5 \cdot 10^{-3}$ M a partir del cloruro hexahidratado (Panreac), Ni (II) 0,1 M a partir del nitrato hexahidratado (Merck,

Darmstadt, Alemania), K (I) 0,1 M a partir de su nitrato (Panreac), Mg (II) 0,1 M a partir del cloruro hexahidratado (Merck), Ca (II) 0,1 M a partir del cloruro dihidratado, Na (I) 0,1 M a partir de su cloruro, Cu (II) 0,01 M a partir del nitrato trihidratado, Cd (II) 0,1 M a partir del nitrato tetrahidrato y Zn (II) 0,1 M a partir del sulfato monohidratado (todos de Panreac). Todas las disoluciones fueron preparadas disolviendo las correspondientes sales en la disolución reguladora 0,01 M ácido acético/acetato potásico de pH 4,7, preparada a partir de ácido acético e hidróxido potásico (ambos de Panreac).

Para preparar las membranas sensoras se utilizaron los siguientes reactivos: cloruro de polivinilo (PVC; de alto peso molecular), tributilfosfato (TBP), 2-nitrofeniloctileter (NPOE), bis(2-etilhexil)sebacato (DOS), dioctilftalato (DOP), tris(2-etilhexil)fosfato (TEHP) y tetrahidrofurano (THF), todos ellos proporcionados por Sigma (Sigma-Aldrich Química S. A., Madrid). También se utilizaron los ionóforos: 1,4,7,10,13,16-hexatiociclooctadecano, 1,4,7,10,13,16-hexaazaciclooctadecano, 1,4,8,12-tetraazaciclopentadecano, 1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano, 1,4,7,10-tetraazaciclododecano, 1,4,7-triazaciclononano y 1,4,7-tritociclododecano, todos ellos proporcionados por Fluka (Madrid); el cromoióforo 9-dimetilamino-5-[4-(15-butil-1,13-dioxo-2,14-dioxanonadecil)fenilimino]benzo[a]fenoxazina también proporcionado por Fluka y posteriormente sintetizado según reza el Anexo I. Como sales lipofílicas se utilizaron: tetrafenilborato de tetrabutilamonio, tetrakis (4-clorofenil)borato potásico, tetrafenilborato de tetraheptilamonio y tetrakis (4-clorofenil)borato de tetradodecilamonio, todas ellas proporcionadas por Fluka. Como soporte sólido de las membranas sensoras se utilizaron láminas de poliéster tipo Mylar (Goodfellow, Cambridge, UK). Todos los reactivos utilizados eran de grado analítico y el agua utilizada era proporcionada por un equipo de ósmosis inversa (Milli-Ro 12 acoplado a un equipo Milli Q de Millipore Corp).

3.3. Preparación de la membrana

La disolución a partir de la cual vamos a preparar las membranas se obtiene pesando 26,00 mg (28,4 % p/p) de PVC, 64,10 mg (70,0 % p/p) de tributilfosfato, 0,12 mg (0,13 % p/p) del 1,4,7,10-tetraazaciclododecano, 1,00 mg (1,09 % p/p) de 9-dimetilamino-5-[4-(15-butil-1,13-dioxo-2,14-dioxanonadecil)fenilimino]benzo[a]fenoxazina (ETH 5418) y 0,39 mg (0,43 % p/p) de tetrafenilborato de tetrabutilamonio en un vial de vidrio y disolviéndolos en

1,0 ml de tetrahidrofurano recién destilado. Se depositan 15 μ l de ese cóctel sobre una lámina de poliéster de 14 mm \times 40 mm \times 0,25 mm de espesor, con ayuda del dispositivo centrífugo de preparación de membranas. Tras dejar la membrana girando a temperatura ambiente durante 30 segundos, se deja estar en un recipiente hermético con atmósfera saturada de tetrahidrofurano, obteniéndose de este modo una película circular sólida, homogénea, adherida al soporte sólido, transparente y de color rojo.

Las dimensiones de la zona sensora son de 10 mm de diámetro y 12 μ m de espesor. La concentración de ionóforo, cromoióforo y anión lipofílico en el sensor una vez preparado son 7,60; 15,16; y 7,58 mmol \cdot kg⁻¹, respectivamente.

3.4. Medida de absorbancia

El parámetro analítico utilizado ha sido la medida de la absorbancia de la tira reactiva a la longitud de onda de 670 nm frente a una lámina de poliéster Mylar. Las medidas de absorbancia se realizan usando el soporte anteriormente descrito, con el que se mejora la reproducibilidad de las mismas, ya que se mide en una zona con diámetro constante (5 mm) e inferior al diámetro de la zona activa del sensor. De esta manera, obviamos la variabilidad de tamaño de dicha zona entre diferentes membranas así como el grosor variable de los bordes.

3.5. Procedimiento propuesto para muestras y patrones

3.5.1. Procedimiento para 5 minutos de equilibración

Se toma una alícuota (10 mL) de una disolución patrón conteniendo entre 7,9 y 107,8 μ M de mercurio (II) y se introduce en un tubo de polietileno de 10x1,5 cm junto con la tira reactiva anteriormente preparada durante cinco minutos sin agitación. A continuación, se extrae la membrana, se sacude para eliminar las gotas de disolución que la puedan mojar, y se mide la absorbancia a 670 nm como se ha descrito en el apartado 3.4.

3.5.2. Procedimiento para 60 minutos de equilibración

Se toma una alícuota (10 mL) de una disolución patrón conteniendo entre 0,3 y 5,1 μM de mercurio (II) y se introduce en un tubo de polietileno de 10x1,5 cm junto con la tira reactiva anteriormente preparada. A continuación, se equilibra la membrana durante sesenta minutos en un agitador vibratorio a 600 oscilaciones por minuto. Tras la equilibración se procede de igual forma que en el procedimiento para cinco minutos.

Todas las medidas se llevan a cabo a temperatura ambiente y no es necesario preacondicionar las membranas antes de usarlas.

En el caso de las muestras de agua, se introduce 1 mL de muestra en un tubo de polietileno junto con 9 mL de tampón ácido acético/acetato potásico 0,01 M de pH 4,7, se elige el tiempo de equilibración adecuado dependiendo de la concentración de mercurio en la muestra y se opera igual que antes.

4. Resultados y discusión

4.1. Composición de la membrana

Para desarrollar una tira reactiva de un solo uso es necesario tener en cuenta varios aspectos a la hora de seleccionar los reactivos implicados en su construcción; aspectos como, extensión de la reacción en fase sólida, velocidad de respuesta, selectividad y coste. Nuestra tira reactiva está formada por una membrana que contiene todos los reactivos necesarios para la extracción y reconocimiento de mercurio (II), reactivos que están disueltos en un polímero formador de membrana plastificado [26]. El proceso huésped-anfitrión de reconocimiento de mercurio por el ionóforo L va acoplada al intercambio de un ión de referencia, un protón, que es reversiblemente complejoado por el cromoióforo C, y actúa como transductor del proceso de reconocimiento. También es necesaria la presencia de una sal de anión lipofílico que le aporta a la membrana la capacidad de cambio iónico.

El problema fundamental de los sistemas basados en el uso de ionóforos, que generalmente son éteres corona, es el intenso efecto interferente de los iones alcalinos y alcalinotérreos. Para superar este problema mediante la disminución de la constante de

formación de los complejos con iones alcalinos y alcalinotérreos, se probaron como ionóforos distintos éteres corona comerciales aza- y tio-sustituidos de tamaño de anillo comprendido entre 9 y 18 átomos; en concreto: 1,4,7,10,13,16- hexaazaciclooctadecano (C18N6), 1,4,7,10,13,16-hexatiociclooctadecano(C18S6), 1,4,8,12- tetraazaciclopentadecano (C15N4), 1,4,8,11- tetraazaciclotetradecano (C14N4), 1,4,7- tritioiclododecano (C10S3) y 1,4,7- triazaciclononano (C9N3).

Como cromoionóforo se eligió el 9-dimetilamino-5-[4-(15-butil-1,13-dioxo-2,14-dioxanonadecil)fenilimino]benzo[a]fenoxazina, también conocido como ETH 5418, ya que presenta un pKa de 6.8 [27] compatible con el pH de trabajo de los metales pesados.

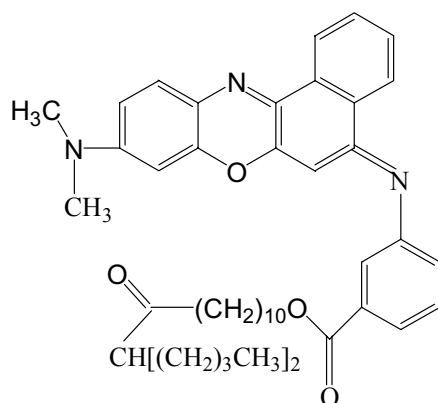


Figura 5.2. Estructura del cromoionóforo ETH 5418

Como sales lipofílicas se probaron las siguientes: tetrakis(4-clorofenil)borato potásico, tetrafenilborato de tetrabutilamonio, tetrafenilborato de tetraheptilamonio y tetrakis(4-clorofenil)borato de tetradodecilamonio, observando que las dos últimas no dieron prácticamente respuesta y las dos primeras dieron una respuesta parecida. Finalmente se seleccionó el tetrafenilborato de tetrabutilamonio porque originaba membranas con mejores propiedades físicas que el tetrakis(4-clorofenil)borato potásico. Ya que la influencia del plastificante tiene especial importancia en la selectividad y en la velocidad de respuesta del sensor, se probaron distintos plastificantes tales como TBP, TEHP, NPOE, DOP y DOS.

Se prepararon hasta 35 cócteles diferentes, cada uno de los cuales contenía uno de los siete ionóforos estudiados, el cromoionóforo (ETH 5418) y la sal lipofílica (tetrabutilamonio tetrafenilborato) en relación molar 2:1:1, PVC y uno de los diferentes plastificantes estudiados. Las membranas con ellos preparados fueron ensayadas frente a disoluciones 0,001 M de Ca (II), Mg (II), Mn (II), Fe (III), Ni (II), Ag (I), Zn (II), Cd (II), Hg (II), Cu (II), Pb (II) y Al (III), a pH 4,7, midiendo después de 5 minutos de reacción y calculando $1-\alpha$ (Figura 5.3).

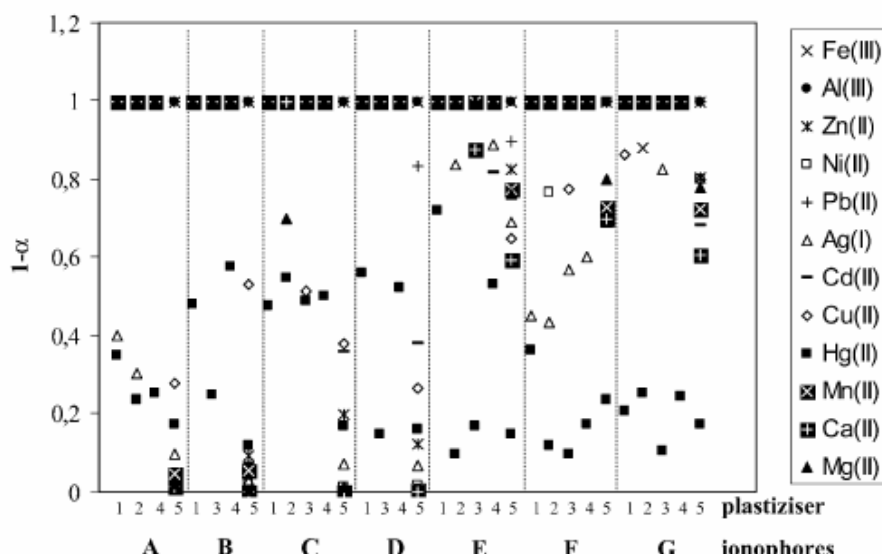


Figura 5.3. Respuesta ($1-\alpha$) para diferentes metales con distintos plastificantes e ionóforos: (1) DOP; (2) DOS; (3) NPOE; (4) TEHP; (5) TBP. (A) C18S6; (B) C18N6; (C) C15N4; (D) C14N4; (E) C12N4; (F) C10S3; (G) C9N3.

Utilizando TBP como plastificante, todas las membranas originan una respuesta a mercurio con gran desplazamiento del equilibrio, como indican los bajos valores obtenidos para $1-\alpha$, de acuerdo con la secuencia C18N6 > C12N4 > C14N4 > C15N4 \approx C18S6 \approx C9N3 > C10S3. Por otro lado, los iones alcalinos y alcalinotérreos responden intensamente de acuerdo con la secuencia: C18N6 \approx C15N4 \approx C14N4 > C18S6 \gg C12N4 > C9N3 > C10S3, como era de esperar debido a la selectividad proporcionada por el tamaño del macrociclo de los distintos éteres corona y el tamaño de los diferentes iones. Utilizando TEHP como

plastificante, el orden de respuesta de los distintos ionóforos a Hg (II) fue el mismo que con el TBP, aunque el nivel de respuesta a Hg (II) fue menor en este caso. Cuando utilizamos DOP como plastificante, el orden de respuesta de los distintos ionóforos a Hg (II) fue: C9N3 > C18S6 \approx C10S3 > C15N4 \approx C18N6 > C14N4 > C12N4, y utilizando DOS: C12N4 > C10S3 > C18S6 > C9N3 > C15N4 > C14N4 \approx C18N6. En el caso del NPOE, el orden de respuesta a Hg (II) encontrado fue: C10S3 \approx C9N3 > C14N4 > C12N4 > C18N6 > C15N4 > C18S6. Aunque DOS, DOP y NPOE proporcionaban una buena respuesta a mercurio con todos los ionóforos estudiados, ninguno de ellos fue seleccionado como plastificante porque la velocidad de respuesta se incrementaba según el siguiente orden: TBP \gg DOS > DOP > TEHP > NPOE. Por esta razón seleccionamos al TBP como plastificante y para este plastificante el ionóforo seleccionado fue el 1,4,7,10-tetraazaciclododecano (C12N4) por su alto nivel de respuesta a Hg (II) y baja respuesta a iones alcalinos y alcalinotérreos.

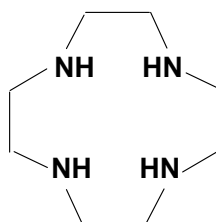


Figura 5.4. Ionóforo 1,4,7,10-tetraazaciclododecano

En experimentos previos se observó el carácter irreversible de la reacción de reconocimiento de mercurio en todas las membranas, ya que una vez que había tenido lugar la reacción entre la membrana y los iones Hg (II), ya no experimentaban cambios por adición de HCl o NaOH. El comportamiento irreversible de membranas basadas en ionóforos neutros tras reaccionar con mercurio ha sido descrito anteriormente [28]. No obstante, la reacción con otros iones metálicos estudiados es reversible excepto para el caso del ión Ag (I). A pesar de esto, seguimos con el estudio de esta membrana como tira reactiva para mercurio, porque la reversibilidad no es una condición indispensable para el desarrollo de una tira reactiva de un solo uso. El carácter irreversible de la reacción puede justificarse por la alta constante de estabilidad K_{Hg} del complejo formado con mercurio. El valor de esta constante,

calculado a partir de datos polarográficos, para el complejo 1:1 de Hg (II) con el ionóforo 1,4,7,10-tetraazaciclododecano es $25,5 \pm 0,3$ (expresado como $\log K_{\text{Hg}}$) [29]. En este caso el ión Hg (II) ($1,10 \text{ \AA}$) es encapsulado con dificultad en el anillo macrocíclico, lo que reduce el efecto macrociclo en comparación con los correspondientes análogos de cadena abierta. La similitud en el valor de $\log K_{\text{Hg}}$ del complejo macrocíclico con respecto al de cadena abierta ($24,5 \pm 0,3$) se debe a la combinación de dos factores, un valor menos favorable de ΔH ($-23,6 \pm 0,5 \text{ Kcal mol}^{-1}$) debido a la inusual tensión conformacional o a la complejación incompleta debida al impedimento estérico, y un valor más favorable de ΔS ($37,7 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$) para el primero.

Para optimizar la proporción de los componentes que forman la membrana sensora estudiamos la influencia de la relación molar anión lipofílico / ionóforo y la influencia del porcentaje de plastificante en la respuesta del sensor. La composición óptima de la membrana fue establecida considerando la influencia modificadora de la selectividad de la relación anión lipofílico / ionóforo. Para hacer esto, se determinó el coeficiente aparente de selectividad K_{aHg}^j para los iones Ca (II), Mg (II), Mn (II), Fe (III), Ni (I), Ag (I), Zn (II), Cd (II), Hg (II), Cu (II) y Pb (II), utilizando el método de las disoluciones separadas [30], para diferentes membranas a un tiempo de equilibración predeterminado (5 minutos); ya que se observó que este tiempo era suficiente para obtener respuesta analítica en todos los casos.

La cantidad de cromoióforo se mantuvo constante, en una cantidad necesaria para minimizar el error fotométrico de las medidas de absorbancia, mientras que la proporción molar anión lipofílico:ionóforo se varió entre 1:1 y 2,5:1.

Puede observarse en la Figura 5.5 que la selectividad disminuye para todos los casos cuando la relación molar anión lipofílico:ionóforo pasa de 1:1 a 2:1 y que la mejor selectividad se obtiene usando una relación molar anión lipofílico:ionóforo de 1:1. La Tabla 5.1 muestra los valores de K_{aHg}^j para esta relación molar.

Para optimizar las cantidades de PVC y plastificante TBP utilizados para la preparación de la membrana, se estudió el tiempo de respuesta del sensor preparando tiras reactivas que contenían diferentes cantidades de TBP comprendidas entre un 50% y un 80% con respecto a los demás componentes de la membrana. Las tiras reactivas preparadas se

pusieron en contacto, sin agitación, con una disolución $1 \cdot 10^{-4}$ M de Hg (II) y se calculó el tiempo necesario para alcanzar una señal de absorbancia estable para los distintos porcentajes de plastificante estudiados. Los resultados obtenidos fueron: 2,3 minutos para el 50%, 1,2 minutos para el 60%, 48 segundos para el 70% y 55 segundos para el 80%. Para porcentajes superiores al 70%, empeoran las propiedades físicas de la membrana, pues son menos homogéneas, de poco espesor y aumenta el tiempo de secado durante la preparación. Esta forma de trabajar se repitió con el PVC obteniéndose unos resultados coherentes que ratifican un 70% TBP y un 28,4% de PVC, dejando un 1,65% en peso para componentes minoritarios como son ionóforo, cromoióforo y sal lipofílica.

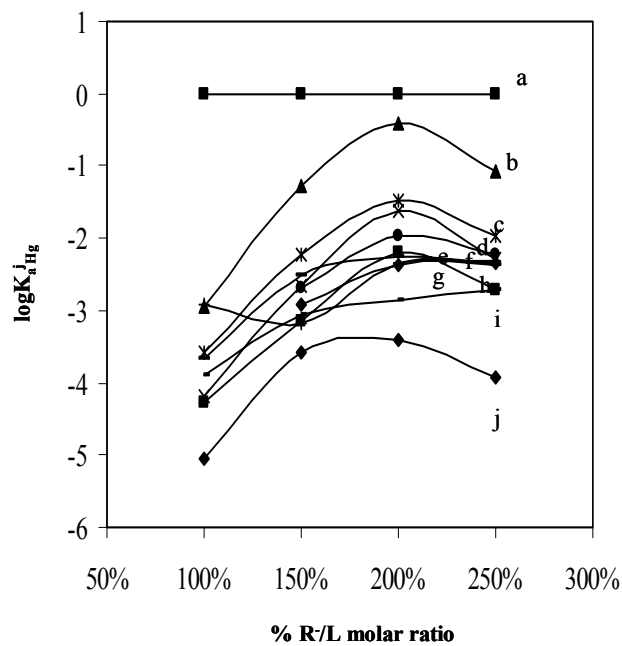


Figura 5.5. Variación de la selectividad del sensor en función de la relación molar anión lipofílico/ionóforo.

Tabla 5.1. Valores de los coeficientes de selectividad calculados por el método de las disoluciones separadas para Hg(II) a pH 4,7.

R/L	-log $K_{Hg,K}$	-log $K_{Hg,Na}$	-log $K_{Hg,Ca}$	-log $K_{Hg,Mg}$	-log $K_{Hg,Cd}$	-log $K_{Hg,Zn}$	-log $K_{Hg,Fe}$	-log $K_{Hg,Pb}$	-log $K_{Hg,Ni}$	-log $K_{Hg,Cu}$
1:1	-5,04	-4,28	-2,94	-4,19	-3,59	-	-2,92	-3,91	-3,65	-
1,5:1	-3,58	-3,56	-1,28	-2,65	-2,24	-2,69	-3,18	-3,05	-2,51	-2,92
2:1	-3,40	-2,19	-0,41	-1,62	-1,47	-1,95	-2,34	-2,85	-2,25	-2,38
2,5:1	-3,91	-2,70	-1,07	-2,29	-1,95	-2,21	-2,31	-2,72	-2,36	-2,34

4.2. Parámetros relacionados con el proceso de equilibrio

La Figura 5.6 muestra la influencia del pH en la respuesta de la membrana, destacando no solo el habitual desplazamiento horizontal [26], sino también un cambio en la pendiente de la función, lo que puede atribuirse al complejo comportamiento que presenta este ión en disolución, pudiendo formar hidroxido y acetato complejos de diferentes estequiometrias, que son pH dependientes. Finalmente, seleccionamos el pH 4,7 como pH de trabajo porque era el que presentaba un mayor rango de respuesta. Se probaron diferentes disoluciones tampón de pH 4,7 y concentración $1 \cdot 10^{-2}$ M: ácido acético/acetato sódico, ácido acético/acetato potásico, ácido acético/acetato magnésico y ácido acético/acetato de litio. Seleccionamos el tampón ácido acético/ acetato potásico $1 \cdot 10^{-2}$ M de pH 4,7 como óptimo porque originaba menos interferencias que el resto de los tampones, lo que era de esperar según los valores obtenidos para los coeficientes de selectividad aparentes.

El tiempo de respuesta de las membranas basadas en un sistema de dos componentes no suele ser muy alto, normalmente del rango de unos minutos, siempre que la concentración de analito no sea muy baja [31]. En nuestro caso, por el contrario, encontramos un tiempo de respuesta largo, debido a que la etapa que limita el tiempo de respuesta no es la difusión del analito dentro de la fase orgánica plastificada, sino la extracción convectiva de materia desde el seno de la disolución hasta la membrana. En este caso, el comportamiento irreversible de la tira reactiva es debido a la alta constante de equilibrio del complejo metal-ionóforo, lo que hace posible preconcentrar mercurio en la zona sensora si el tiempo de contacto entre la disolución y la membrana se aumenta. Por lo tanto, el tiempo de equilibración necesario para

el desarrollo de la señal analítica es variable dependiendo de la concentración de analito que haya en la muestra. Al objeto de aumentar la velocidad de respuesta del método se decidió agitar la disolución con la tira reactiva para facilitar así el transporte del mercurio desde la disolución hasta la superficie del sensor. Se ensayaron diferentes tipos de agitación (agitador magnético, agitador rotatorio y agitador vibratorio) y se encontró que los mejores resultados, esto es una coloración más homogénea de la membrana, se lograron usando un agitador vibratorio operando a 800 oscilaciones por minuto para un nivel de concentración que depende del tiempo de agitación (Tabla 5.2).

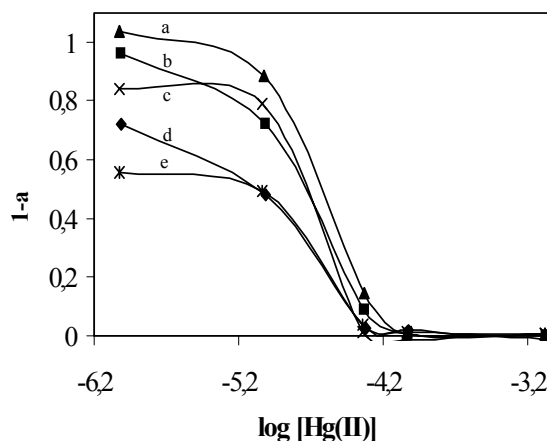


Figura 5.6. Influencia del pH en la respuesta del sensor: a) pH 4,7; b) pH 4,4; c) pH 5,4; d) pH 3,9; e) pH 5,9.

Tabla 5.2. Comparación de la respuesta ($1-\alpha$) frente al tiempo de reacción para una disolución $1 \cdot 10^{-6}$ M en Hg (II), con (agitación vibratoria a $800 \text{ oscilaciones min}^{-1}$) y sin agitación.

Tiempo (min)	$1-\alpha$	
	Sin agitación	Con agitación
5	0,956	0,868
15	0,921	0,663
30	0,902	0,448
60	0,810	0,320
120	0,705	0,315

Media de 3 réplicas en todos los casos

4.3. Parámetros analíticos

Como se ha discutido anteriormente [16], se ha usado como rango de medida la relación lineal establecida en la parte intermedia de la función respuesta sigmoideal definida por medio de un test de fallo de ajuste y como límite de detección la intersección de la función de calibración lineal que acabamos de indicar con la función lineal ajustada en la zona de mínima pendiente, tal como muestra la Figura 5.7.

Se caracterizó la tira reactiva propuesta a dos tiempos de equilibración diferentes: 5 minutos sin agitación y 60 minutos con agitación empleando dos serie de patrones cada vez, la primera en la zona de máxima pendiente (cinco patrones, nueve replicas cada uno), entre $1 \cdot 10^{-5}$ y $1 \cdot 10^{-4}$ M para el tiempo de equilibración de 5 minutos y (nueve patrones, ocho réplicas cada uno) entre $1 \cdot 10^{-6}$ y $1 \cdot 10^{-5}$ M para 60 minutos. La segunda serie se establece en la zona independiente de la concentración (tres patrones, nueve réplicas de cada uno) entre $1 \cdot 10^{-8}$ y $1 \cdot 10^{-6}$ M para 5 minutos de equilibración y (seis réplicas, ocho réplicas cada uno) entre $1 \cdot 10^{-9}$ y $1 \cdot 10^{-7}$ M para 60 minutos de equilibración. Cada réplica se mide con una tira reactiva diferente debido al carácter irreversible de la misma.

La linealidad de cada serie se prueba aplicando el test de fallo de ajuste [30], para el tiempo de equilibración de 5 minutos las funciones lineales obtenidas fueron:

$$1-\alpha = -3,3087 - 0,8335 \log[\text{Hg(II)}]$$

$$1-\alpha = 0,8644 - 0,0155 \log[\text{Hg(II)}]$$

Y para el tiempo de equilibración de 60 minutos:

$$1-\alpha = -3,9341 - 0,7429 \log[\text{Hg(II)}]$$

$$1-\alpha = 1,0557 - 0,0151 \log[\text{Hg(II)}]$$

El límite de detección se calcula de la intersección de ambas funciones, obteniéndose un valor de $7,9 \mu\text{M}$ ($1,6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) para 5 minutos sin agitación y de $0,3 \mu\text{M}$ ($60,2 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) para 60 minutos con agitación.

El límite superior del rango de medida fue obtenido a partir de la intersección de la función lineal de máxima pendiente con el eje de abscisas; el valor obtenido fue de $107,8 \mu\text{M}$

para el procedimiento de 5 min, y 5,1 μM para el procedimiento de 60 minutos. Por ello, el rango de medida para mercurio sería 7,9 μM - 107,8 μM ($1.6 - 21.6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) para 5 minutos y 0,3 - 5,1 μM ($60,2 - 1023 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) para 60 minutos.

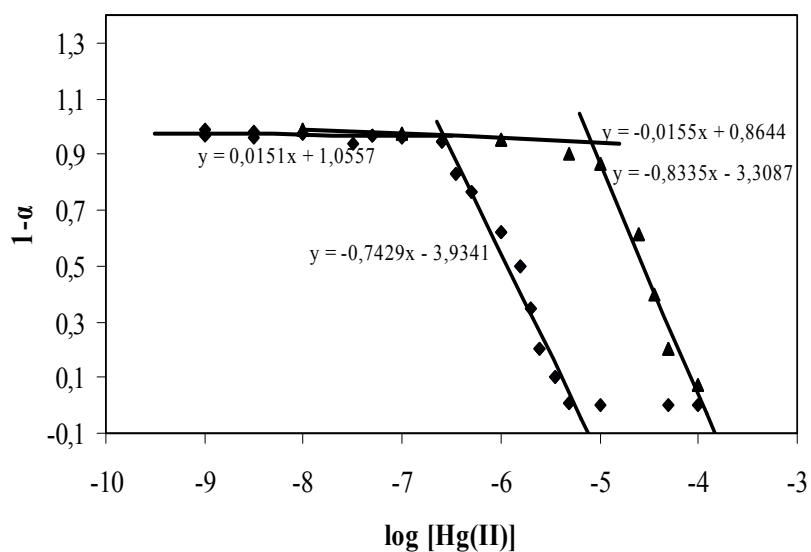


Figura 5.7. Funciones de calibrado para Hg (II). A: 5 min de agitación; B: 60 minutos de agitación.

Para evaluar la precisión del procedimiento propuesto (expresada como la desviación estándar relativa, DER) se realizó un estudio a dos niveles de concentración comprendidos dentro del rango dinámico lineal, para el procedimiento de 5 minutos se estudiaron disoluciones 10 y 50 μM de Hg (II), y 0,5 y 2,5 μM para el procedimiento de 60 minutos, midiéndose 10 réplicas de cada nivel de concentración. Los valores de DER obtenidos para el procedimiento de 5 minutos fueron 1,1 y 1,8 %, y 1,8 y 1,6 % para el procedimiento de 60 minutos en términos de $\log C_{\text{Hg}^{2+}}$. La Tabla 5.3 nos muestra estos y otros parámetros analíticos.

Tabla 5.3. Parámetros analíticos.

Parámetro	Valor, S (5 min)	Valor, S (60 min)
Ordenada en el origen	-3,3087; 0,1403	-3,9341; 0,1193
Pendiente	-0,8335; 0,0311	-0,7429; 0,0199
Nivel de probabilidad % (lack-of-fit test)	6,26	5,04
Límite inferior (μM)	7,9	0,3
Rango lineal (μM)	7,9 – 107,8	0,3 – 5,1
DER (%) ^a	1,1 (10 μM^b) 1,8 (50 μM^b)	1,8 (0,5 μM^b) 1,6 (2,5 μM^b)
Tiempo de vida	1 mes	
Coste	0,04 € / tira	

a: DER en términos de $\log [\text{Hg} (\text{II})]$, b: concentraciones

4.4. Aplicaciones y validación

Con el objetivo de comprobar la utilidad y validez del procedimiento propuesto, se aplicó a muestras de agua de diversa procedencia (mineral, manantial, y aguas de abastecimiento urbano). En todos los casos se realizaron estudios de recuperación utilizando 1 ml de agua adicionada con 0,40 μM de Hg (II) mezclada con 9 ml de tampón acetato 0,01 M de pH 4.7. La Tabla 5.4 muestra los resultados obtenidos por el procedimiento propuesto comparados con los de espectroscopia de absorción atómica de vapor frío usado como método de referencia. Dicha tabla 5.4 también incluye los valores medios de tres determinaciones para cada muestra y el valor de probabilidad (P_{val}) del test usado para comparar las medidas obtenidas por cada uno de los métodos. Se puede observar que no existe diferencia significativa entre los resultados obtenidos mediante la tira reactiva desarrollada y los obtenidos mediante el método de referencia, pues siempre el valor $P_{\text{value}} > 5\%$.

Tabla 5.4. Determinación de mercurio en diferentes tipos de agua usando AAS como método de referencia

Muestra	Tira reactiva ($\mu\text{M Hg}$)	S	AAS ($\mu\text{M Hg}$)	S	P _{val} (%)
Agua de manantial (<i>Dírcal, Granada</i>)	0,39	0,17	0,42	0,09	78,62
Agua mineral (Sierras de Jaén)	0,41	0,09	0,39	0,04	73,02
Agua mineral (Solán de cabras)	0,38	0,07	0,36	0,04	64,98
Agua mineral (Lanjarón)	0,38	0,09	0,41	0,05	68,93
Agua mineral (Mondariz)	0,38	0,17	0,39	0,08	93,26
Agua mineral (Bonaqua)	0,43	0,06	0,43	0,06	97,75
Agua urbana (Granada)	0,35	0,09	0,38	0,04	89,54
Agua urbana (Carchuna, Granada)	0,34	0,09	0,40	0,06	40,50
Agua urbana (Huetor, Granada)	0,40	0,14	0,30	0,04	39,54

5. Conclusiones

Hemos desarrollado una tira reactiva para la determinación de Hg (II) en agua. La tira reactiva propuesta es irreversible, de tipo óptico (medimos su absorbancia por transmisión), se basa en el uso del ionóforo neutro 1,4,7,10-tetraazaciclododecano y presenta buena selectividad hacia mercurio. El carácter irreversible de la reacción entre mercurio y la zona sensora que contiene al ionóforo neutro, al cromoionóforo y a la sal aniónica lipofílica, no imposibilita su uso en formato tira reactiva para la determinación de mercurio. Un incremento en el tiempo de reacción permite detectar concentraciones más bajas de mercurio, pudiendo ajustar el procedimiento al problema en cuestión. Todos los reactivos necesarios para la determinación de mercurio están contenidos en la zona sensora, lo que implica que solo será necesario tamponar la muestra antes del análisis. La tira reactiva aquí propuesta ofrece buenos resultados en términos de exactitud, precisión y coste, lo que la hace apta para llevar a cabo análisis rutinarios y análisis *in situ* que utilicen instrumentación portátil sin necesidad de una manipulación previa de la muestra.

Agradecimientos

Agradecemos la financiación al Ministerio de Educación y Cultura, Dirección General de Enseñanza Superior (Proyecto N° BQU2002-00353).

Bibliografía

- [1] E. Merian, *Metals and Their Compounds in the Environment*, VCH, Weinheim, (1991).
- [2] R. P. Mason, J. R. Reinfelder, F. M. M. Morel, *Water Air Soil Pollut.*, 80, 915 (1995).
- [3] C. T. Cosrley, K. F. Mossop, J. R. Dean, L. M. Garden, J. Marshall y J. Carroll, *Anal. Chim. Acta*, 405, 179 (2000).
- [4] W. L. Clevenger, B. W. Smith y J. D. Winefordner, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 27, 1 (1997).
- [5] B. Walter, *Anal. Chem.*, 55, 498A (1983).
- [6] P. Vogel, D. Thym, M. Fritz y D. Mosoiu, US Patent 5,302,346 (1994).
- [7] J. H. Priest y E. M. Melson, US Patent 5,824,491 (1988).
- [8] H. Lange, W. Rittersdorf y H. G. Rey, US Patent 3,897,214 (2001).
- [9] L. F. Capitán-Vallvey, M. D. Fernández-Ramos, P. Alvarez de Cienfuegos y F. Satoyo-González, *Anal. Chim. Acta*, 481, 139 (2003).
- [10] G. Shi, y G. Jiang, *Anal. Sci.*, 18, 1215 (2002).
- [11] L. F. Capitán-Vallvey, O. M. A. Al-Barbarawi, M. D. Fernández-Ramos, R. Avidad-Castañeda, y V. Ramirez González, *Analyst*, 125, 2000 (2000).
- [12] M. A. T. Gilmartin, J. P. Hart, y D. T. Patton, *Analyst*, 120, 1973 (1995).
- [13] R. F. Gur'eva y S. B. Savvin, *J. Anal. Chem.*, 58, 990 (2003).

- [14] L. F. Capitán-Vallvey, M. D. Fernández-Ramos, Solid Phase spectrometric assays, in: S. Alegret (Ed.), *Integrated Analytical Systems*, Elsevier, Amsterdam, pp. 81-159 (2003).
- [15] H. Hisamoto, M. Miyashita, K. Watanabe, E. Nakagawa, N. Yamamoto y K. Suzuki, *Sens. Actuators B*, 29, 378 (1995).
- [16] L. F. Capitán-Vallvey, M. D. Fernández-Ramos y P. Alvarez de Cienfuegos, *Anal. Chim. Acta*, 451, 231 (2002).
- [17] K. Y. Anand, L. Koon-Wah, EP 0141647 (1985).
- [18] M. Fritz, D. Thym, P. Vogel y D. Mosoiu, US Patent 5,211,914 (1993).
- [19] W. Rittersdorf, W. Guethlein, D. Thym y P. Vogel, US Patent 5,215,924 (1993).
- [20] M. L. Gantzer, P. R. Hemmes y D. Wong, EP 0153641 (1985).
- [21] S. C. Charlton, EP 0125554 (1984).
- [22] K. E. Piejko, B. Comer, H. Baril y G. Frank, US Patent 4,780,411 (1988).
- [23] Seiler, K., Wang, K., Bakker, E., Morf, W. E., Rusterholz, B., Spichiger-Keller, U. E. y Simon, W., *Clin. Chem.*, 37, 1350 (1990).
- [24] L. F. Capitán-Vallvey, P. Álvarez de Cienfuegos-Gálvez, M. D. Fernández-Ramos, y R. Avidad-Castañeda, *Sens. Actuators B*, 71, 140 (2000).
- [25] K. Seiler, W. Simon, *Anal. Chim. Acta*, 266, 73 (1992).
- [26] E. Bakker, P. Bühlmann y E. Pretsch, *Chem. Rev.*, 97, 3083 (1997).
- [27] E. Bakker, M. Lerchi, T. Rosatzin, B. Rusterholz y W. Simon, *Anal. Chim. Acta*, 278, 211 (1993).
- [28] S. Katama y K. Onoyama, *Anal. Chem.*, 63, 1295 (1991).
- [29] M. Kodama, E. Kimura, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 2335 (1976).
- [30] Analytical Methods Committee, *Analyst* 119, 2363 (1994).
- [31] M. Lerchi, E. Bakker, B. Rusterholz y W. Simon, *Anal. Chem.*, 64, 1534 (1992).

CAPÍTULO 6
DETERMINACIÓN DE MERCURIO
MEDIANTE UN SENSOR ÓPTICO
DE UN SOLO USO BASADO EN LA
DESCOMPOSICIÓN DE
TETRAARILBORATO

DETERMINACIÓN DE MERCURIO MEDIANTE UN SENSOR ÓPTICO DE UN SOLO USO BASADO EN LA DESCOMPOSICIÓN DE TETRAARILBORATO

Resumen

En este capítulo se desarrolla un sensor óptico de un solo uso para determinar mercurio. El sensor está constituido por una lámina de poliéster sobre la cual se deposita la zona sensora preparada a partir de una disolución de PVC que contiene el anión tetraarilborato sensible a Hg (II) y una porfirina protón selectiva que actúa como transductor óptico. El esquema de sensado se basa en la descomposición del anión tetraarilborato inducida por los iones Hg (II), lo que va a suponer la desprotonación de la porfirina y el aumento de la intensidad de fluorescencia de la membrana. El aumento de fluorescencia se mide después de poner en contacto la membrana sensora con una disolución conteniendo Hg (II) a pH 2.4 durante 15 min de reacción, pudiendo detectarse concentraciones de mercurio de hasta $25 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ con una reproducibilidad intermembrana del 6,5% expresada en términos de DER. El sensor propuesto ofrece buena selectividad a Hg (II) frente a otros iones metálicos. Se ha estudiado el mecanismo de respuesta del sensor y las distintas variables experimentales implicadas en su desarrollo.

1. Introducción

El desarrollo de sensores de un solo uso para la determinación de metales pesados presenta gran interés en campos como el de la salud pública y el medioambiental. Entre los diferentes metales pesados cabe destacar el mercurio por su elevada toxicidad y su presencia en la litosfera e hidrosfera [1]; [2]. Las técnicas más utilizadas para llevar a cabo la determinación de mercurio han sido la espectrometría de absorción atómica o de emisión, la espectrometría de masas y la voltamperometría. Para el análisis de las diferentes especies de mercurio se han utilizado en muchas ocasiones métodos cromatográficos con detectores espectrométricos [3]; [4]. Aunque estos métodos son sensibles y precisos, no pueden utilizarse para realizar análisis *in situ*.

Los sensores de un solo uso son dispositivos analíticos autocontenidos miniaturizados que responden a la presencia o concentración de uno o varios analitos, generalmente a través de una reacción química o bioquímica. Los reactivos necesarios para llevar a cabo las reacciones y procesos que van a originar la respuesta analítica están incorporados en el propio sensor, generalmente en formato seco, de forma que no sea necesario preparar ni mezclar los reactivos necesarios para llevar a cabo operaciones de reacción, extracción, precipitación o diálisis, entre otras.

Se han utilizado diversas estrategias para desarrollar sensores de un solo uso sensibles a mercurio de entre las que podemos destacar: i) el uso de reactivos inorgánicos convencionales tales como Cu_2I_2 incorporado en una membrana de carboximetilcelulosa utilizada para la determinación de mercurio en muestras de pescado [5]; ii) reactivos orgánicos convencionales como la tirodina, un análogo de la rodanina, retenida en una membrana de policaproamida, utilizada para la determinación de mercurio en muestras industriales alcanzándose un límite de detección de $5 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ [6]; iii) utilización de ionóforos, tales como el 1,4,7,10-tetraazaciclododecano contenido en una membrana de PVC y basado en un mecanismo de intercambio iónico para determinar mercurio en agua [7]; iv) diferentes tipos de inhibición enzimática, tal como la inhibición de la ureasa por parte de mercurio basada en medidas del tiempo transcurrido hasta la total desaparición del color del indicador de pH utilizado, esta estrategia se ha aplicado para determinar mercurio en agua alcanzando un límite de detección de hasta $0,2 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ [8]; de igual forma, se ha descrito la

inhibición de peroxidasa de rábano picante inmovilizada en papel sobre la reacción de oxidación de la 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina mediante peróxido de hidrógeno alcanzándose un límite de detección de 5-10 $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ [9]; [10]; v) anticuerpos que reconocen formas complejadas de iones metálicos, tal como el caso de EDTA con Hg (II), utilizados para diseñar inmunoensayos [11]; vi) sensores microbiológicos basados en el uso luciferasa de luciérnaga modificada genéticamente con sensibilidad hacia mercurio en el rango picomolar [12]. El principal problema que presentan estos sensores es la falta de selectividad hacia Hg (II) frente a otros metales pesados.

El sensor de un solo uso desarrollado en este capítulo se basa en la reacción de descomposición de un anión tetraarilborato inducida selectivamente por mercurio que conlleva la formación de una serie de derivados fenilmercuriales. Esta reacción ha sido utilizada con diferentes propósitos en análisis químico. Por ejemplo, en análisis gravimétrico, volumétrico [13] o espectrofotométrico [14] para determinar potasio y otros iones alcalinos y alcalinotérreos [15]; determinación volumétrica de tetraarilboratos, por medio de mercurimetría [16] y bromatometría [17]; derivatización organomercurial previa al análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de fluorescencia atómica o a espectrometría de emisión atómica [18]; conversión *in situ* de mercurio inorgánico a mercurio orgánico combinada con la extracción por fluidos supercríticos del mercurio orgánico [19]; determinación voltamperométrica de Hg (II) monitorizando el descenso del pico de oxidación del tetrafenilborato en un electrodo de pasta de carbono [20].

Murkovic y Wolfbeis [21] han utilizado esta reacción para desarrollar un sensor óptico para determinar Hg (II) basado en una membrana de PVC que contiene un colorante fluorescente como es la oxacarbocianina y una sal de tetraarilborato, cuya descomposición inducida por Hg (II) conlleva la formación de agregados no fluorescentes del colorante.

En este capítulo utilizamos la reacción de descomposición de un anión tetraarilborato para desarrollar un sensor óptico de un solo uso irreversible para determinar Hg (II). En la etapa de transducción utilizamos un fluoroionóforo selectivo a protones que va a variar su intensidad de fluorescencia como consecuencia de su desprotonación inducida por la descomposición de la sal lipofílica producida por la entrada de mercurio en la membrana.

2. Experimental

2.1. Reactivos y materiales

Todos los reactivos utilizados eran de grado analítico y el agua utilizada para preparar las disoluciones procedía de un equipo de ósmosis inversa Milli-Ro 12 acoplado a un equipo Milli Q de Millipore Corp, Bedford, MA.

La disolución madre ($1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) de Hg (II) se preparó disolviendo la cantidad exacta de nitrato mercúrico, $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2\cdot\text{H}_2\text{O}$, (Probus, Barcelona, España), en ácido nítrico 0,2 M diluido con agua purificada. Las disoluciones más diluidas se prepararon a partir de la disolución madre por dilución con agua. Las disoluciones madre ($1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) de los demás iones metálicos se prepararon con una cierta cantidad de ácido cuando era necesario, a partir de los correspondientes nitratos de cobre, cadmio, calcio, magnesio y sodio (Panreac, Barcelona, España), níquel y plomo (Merck, Darmstadt, Alemania), a partir de los correspondientes sulfatos de hierro (II) (sal de Mohr), hierro (III), potasio (Panreac), cinc y manganeso (Merck). Las distintas disoluciones fueron contrastadas volumétricamente o utilizando espectrometría de absorción atómica. La disolución reguladora de pH 2,4 1M fue preparada a partir de ácido ortofosfórico (Probus) e hidróxido sódico (Panreac).

Para preparar las membranas sensibles a mercurio se utilizaron los siguientes reactivos: cloruro de polivinilo (PVC; de alto peso molecular), 5,10,15,20-tetrafenil-21H, 23H-porfirina (TPP), tributilfosfato (TBP), 2-nitrofeniloctileter (NPOE), bis(2-etilhexil)sebacato (DOS), dioctilftalato (DOP), tris(2-etilhexil)fosfato (TEHP) y tetrahidrofurano (THF) todos ellos proporcionados por Sigma (Sigma-Aldrich Química S. A., Madrid) y tetrafenilborato sódico (TPB), tetrakis [3,5-bis(trifluorometil)fenil] borato de sodio (BPB) y tetrakis(4-clorofenil)borato (TCB), proporcionados por Fluka (Fluka, Madrid, España). Como soporte sólido de las membranas sensoras se utilizaron láminas de poliéster tipo Mylar (Goodfellow, Cambridge, UK).

2.2. Instrumentación y software

Las medidas de estado estacionario se realizaron con un espectrofotómetro Hewlett-Packard HP-8453 de diodos en fila conectado a un ordenador personal Pentium MMX 200 a través de una interfase HP IB para las medidas de absorción y espectrofluorímetro Cary Eclipse (Varian Australia Pty Ltd.) conectado a un ordenador personal Pentium 4 2.40 GHz a través de un IEEE-488 (GPIB) para las medidas de fluorescencia. Las medidas de tiempo de vida se llevaron a cabo utilizando la técnica de time-correlated single photon counting mediante espectrofluorímetro OB 920 equipado con una lámpara flash de nanosegundos 900-HP y como sistema de detección un fotomultiplicador de foton único S900 (Edinburgh Instruments Ltd, Livingston, UK), conectado a un ordenador personal AMD Athlon™ XP 2400+ 2.00 GHz a través de una tarjeta EAI TCC/PCS. La recogida y tratamiento de los datos de tiempo de vida fue llevada a cabo utilizando el software F900 proporcionado por Edinburgh Instruments.

Las medidas de absorbancia y de luminiscencia se realizaron utilizando unos soportes contruidos por nosotros en un bloque de hierro pintado de negro de las dimensiones adecuadas para ser utilizados en cada uno de los compartimentos de cubetas de los espectrofotómetros anteriormente citados. Para las medidas de absorción, el soporte tenía un orificio de 5 mm diámetro para el paso de la radiación y una rendija perpendicular al mismo de 1 mm de espesor, que es donde se introduce la tira reactiva para su medida [22]. En el caso de la luminiscencia, las medidas se realizaron por transmisión y el soporte tenía dos orificios ortogonales de 5 mm de diámetro y una rendija diagonal de 1 mm de espesor de manera que los haces de excitación y emisión forman un ángulo de 45° con el plano del sensor [23]. Con el uso de estos soportes se aumenta la reproducibilidad de las medidas, ya que se llevan a cabo en una zona de diámetro constante (5 mm) e inferior a la zona activa del sensor.

Las medidas de pH se llevaron a cabo utilizando un pH-metro digital provisto de electrodo combinado de vidrio y cloruro de plata (Crison, Barcelona, España) calibrado a $20 \pm 2^\circ\text{C}$ con disoluciones tampón de pH 7,00 y 4,00 (Merck). Los sensores se prepararon utilizando un sistema rotatorio de velocidad de giro variable diseñado por nosotros [24].

2.3. Preparación de la membrana sensora y sistema de medida

La disolución a partir de la cual vamos a preparar las membranas se obtiene pesando 30,0 mg (19,82 % p/p) de PVC, 121,0 mg (79,95 % p/p) de DOS, 0,10 mg (0,07 % p/p) de TPP, 0,24 mg (0,16 % p/p) de TCB en un vial de vidrio. Estos componentes fueron disueltos en 1,0 ml de tetrahidrofurano recién destilado. Se depositan 15 μ l de ese cóctel sobre una lámina de poliéster de 14 mm \times 40 mm \times 0,5 mm de espesor, con ayuda de un sistema centrífugo de preparación de membranas [24] que gira a 180 rpm. Tras dejar la membrana girando durante 30 segundos, se deja estar en un recipiente hermético con atmósfera saturada de tetrahidrofurano durante 3 minutos a temperatura ambiente y luego se almacena en un lugar protegido de la luz hasta su posterior uso. La zona sensora del sensor desechable obtenida de este modo es una película circular sólida, homogénea, adherida al soporte sólido, transparente, de color naranja-rosáceo, de 12 mm de diámetro y aproximadamente 22 μ m de espesor. Las concentraciones de TPP y TCB en el sensor una vez seco son 1,07 mmol \cdot kg⁻¹ y 3,20 mmol \cdot kg⁻¹, respectivamente.

La respuesta de los diferentes sensores así preparados se evaluó disponiendo 10 mL de una disolución patrón conteniendo entre 0,1 y 5,3 μ M (en concentraciones) de Hg (II) y 1,0 mL de disolución tampón de ácido ortofosfórico/dihidrógeno ortofosfato sódico de pH 2,4 y concentración 1 M, en un tubo de polietileno de 10 mL de volumen junto con la membrana desechable. A continuación, se equilibra la membrana durante 15 minutos en un agitador vibratorio a 800 oscilaciones por minuto, y tras la equilibración se extrae la misma, se sacude para eliminar las gotas de disolución que la puedan mojar, y se mide su intensidad de fluorescencia excitando a 420 nm y registrando la emisión a 650 nm, utilizando rendijas de 5 nm tanto en excitación como en emisión. El soporte de poliéster no es fluorescente en estas condiciones de medida, por lo que no es necesario sustraer la señal del blanco. Todas las medidas se llevaron a cabo a temperatura ambiente (20 \pm 3 °C) y no fue necesario precondicionar las membranas antes de usarlas.

2.4. Cálculos

Como parámetro analítico utilizamos una intensidad de fluorescencia normalizada α (ec 6.1), en realidad $1-\alpha$, en la que F_0 es la intensidad de fluorescencia mínima y F_1 es la intensidad de fluorescencia máxima, valores que corresponden a la forma totalmente protonada y desprotonada (total reacción con Hg (II)) del luminóforo TPP, respectivamente. Estos valores se obtienen midiendo la intensidad de fluorescencia del sensor después de haber estado en contacto con el tampón fosfato a pH 2,4 (F_0) y con una disolución 10^{-4} M de Hg (II) preparada en el mismo tampón (F_1).

$$\alpha = \frac{[H_2L^{2+}]}{C_L} = \frac{F - F_0}{F_1 - F_0} \quad (6.1)$$

La constante de extracción K_e se calculó de acuerdo con la referencia [25], utilizando los valores de la zona de máxima pendiente de la función respuesta a mercurio, lo que proporciona menos error. Las actividades se calcularon utilizando la ecuación de Debye-Hückel de dos parámetros [26]. Los programas utilizados para el tratamiento de datos fueron: Statgraphics Plus Versión 6.0, STSC. Inc., de Statistical Graphics Corp., USA, 1993, y GraphMatica para Win32 v1.60d, 1998 editado por K. Hertzler y adaptado por J. Garrido.

3. Resultados y discusión

3.1. Esquema de sensado

El esquema de sensado utilizado para determinar mercurio con este sensor desechable se basa en la descomposición de un anión tetraarilborato presente en la membrana por parte de los iones Hg (II), originándose como consecuencia de la reacción derivados organomercuriales. Se sabe que en disolución acuosa los aniones tetraarilborato reaccionan con Hg (II) provocando éste su descomposición y originando monofenilmercurio, difenilmercurio y ácido bórico [27]; [28].

La monitorización óptica de esta reacción se consigue utilizando un fluoroionóforo selectivo de protones, al que a partir de ahora llamaremos luminóforo, que pierde su intensidad de fluorescencia inicial por protonación. Inicialmente la membrana sensora

contiene al luminóforo protonado formando un par iónico con el anión tetraarilborato, cuya descomposición fuerza la desprotonación concomitante del luminóforo lipofílico para mantener la electroneutralidad de la membrana hidrofóbica, recuperando así su emisión luminiscente. Como luminóforo utilizamos un compuesto macrocíclico, la porfirina simétricamente sustituida 5,10,15,20-tetrafenil-21H,23H-porfirina, compuesto caracterizado por presentar una alta simetría, planaridad y deslocalización electrónica. La membrana una vez seca presenta un color naranja-rosáceo debido a la forma inicial de la TPP y tiene máximos de absorción a 420 nm (banda B) y cuatro bandas Q a 515, 550, 590 y 647 nm. Cuando se pone en contacto la membrana sensora con la disolución tampón ácida, ésta cambia a color verde debido a la entrada de protones y subsiguiente protonación de los dos nitrógenos pirrólicos de la TPP, lo que origina configuración no planar de la molécula debido a la repulsión de los átomos de hidrógeno internos del anillo porfirina [29], esto conlleva la modificación del espectro de absorción del luminóforo, presentando ahora una banda B a 440 nm y dos bandas Q a 600 y 658 nm. Todas estas bandas de absorción de la TPP en la membrana de PVC son similares a las observadas para esta misma especie en otros disolventes [29], [30], [31].

El espectro de fluorescencia inicial de la membrana corresponde a la forma base libre de la TPP, caracterizado por presentar dos bandas de emisión a 650 y 716 nm, mientras que la forma protonada de la TPP presenta una banda muy débil a 692 nm. La membrana seca presenta un tiempo de vida de 10,6 ns, dato que contrasta con los 142 ns descritos en benceno [32], pero tras introducirla en medio ácido tanto la intensidad fluorescente como el tiempo de vida decrecen considerablemente. Concretamente, tras introducir la membrana sensora en la disolución tampón de pH 2,4, su tiempo de vida decrece desde 10,6 ns hasta 2,8 ns. Sin embargo, introduciendo esa misma membrana en una disolución $1,0 \cdot 10^{-4}$ M de Hg (II), su tiempo de vida aumentó hasta el valor inicial (11,0 ns) debido a la regeneración del sistema de dobles enlaces conjugados de electrones π . Todos estos tiempos de vida se ajustan a un modelo de decaimiento biexponencial [membrana seca: τ_1 11,3 ns (93%); τ_2 0,6 (7%); χ^2 1,665; membrana a pH 2,4: τ_1 1,1 ns (92%); τ_2 20,9 (8%); χ^2 1,718; membrana a pH 2,4 después de reaccionar con Hg (II): τ_1 13,2 ns (68%); τ_2 6,2 (32%); χ^2 1,400].

3.2. Optimización de la respuesta del sensor

La respuesta de este sensor de un solo uso irreversible aquí desarrollado se ve influenciada por dos tipos de factores: i) composición de la membrana en relación con la proporción de los distintos componentes en el cóctel, y condiciones de preparación de la misma; y ii) condiciones del proceso de reacción entre el sensor propuesto y la disolución problema, como pueden ser el pH, el tiempo de contacto y la actividad del analito.

3.2.1. Composición de la membrana

Como transductor de la reacción de descomposición del anión tetraarilborato por mercurio, seleccionamos un compuesto macrocíclico, la porfirina simétricamente sustituida 5,10,15,20-tetrafenil-21H,23H-porfirina por las siguientes razones: i) su intensa emisión fluorescente en el visible debida al sistema de dobles enlaces conjugados (Figura 6.1) y a la alta movilidad de los electrones π (rendimiento cuántico 0,13 en benceno [32]); ii) su alto carácter lipofílico, que hace posible su inmovilización en la membrana de PVC y el mantenimiento de sus características espectrales; y iii) la pérdida de intensidad de fluorescencia en medio ácido debida a la protonación de los dos átomos de nitrógeno heterocíclicos y la subsiguiente eliminación del sistema conjugado π [33].

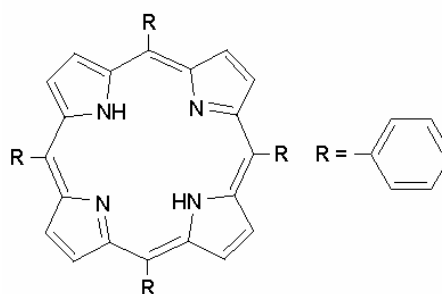


Figura 6.1. Estructura de la 5,10,15,20-tetrafenil-21H,23H-porfirina (TPP).

Se probaron los siguientes aniones tetraarilborato: tetrafenilborato (TPB), tetrakis(4-clorofenil)borato (TCB) y 3,5-bis(trifluorometil)fenilborato (BPB). Se observó que en

ausencia de borato, la membrana no pierde la fluorescencia cuando se pone en medio ácido debido a que los protones no pueden ser extraídos al interior de la membrana y consecuentemente no responden a Hg (II). Por otra parte, este comportamiento de la membrana es irreversible debido a la descomposición del anión tetraarilborato, hecho que demostramos poniendo en contacto una membrana ya reaccionada con mercurio, con una disolución ácida 50 μM de TCB, observándose de nuevo una disminución de la intensidad de fluorescencia de la membrana. Este decrecimiento se debe a la extracción de borato en la membrana, posibilitando así la protonación de la TPP y su consecuente pérdida de intensidad de fluorescencia [21].

La sensibilidad a Hg (II) disminuye conforme aumenta el carácter lipofílico del anión tetraarilborato presente en la membrana, lo que a su vez se relaciona con el sustituyente presente en la molécula y con su estabilidad química [34], hecho similar al encontrado por Murkovic y Wolfbeis [21] en su estudio sobre una membrana sensora a Hg (II) basada en el uso del colorante oxcarbocianina. Nosotros encontramos que el anión más estable, el BPB, no ofrece respuesta alguna a Hg (II), mientras que con TPB y TCB (TPB>TCB) la membrana recupera rápidamente la intensidad de fluorescencia en contacto con Hg (II). Sin embargo, aunque con TPB se alcanza una mayor respuesta, se observa lixiviación de la membrana con la consecuente falta de reproducibilidad que produce este hecho, por esta razón seleccionamos TCB como solución de compromiso para llevar a cabo el estudio.

El tipo de plastificante utilizado en la construcción de la membrana influye considerablemente en la respuesta de la misma a Hg (II); por lo tanto con objeto de seleccionar el mejor plastificante, se llevó a cabo un estudio preliminar con distintos plastificantes: TBP, TEHP, NPOE, DOS y DOP, monitorizando la respuesta frente a una disolución 10^{-6} M de Hg (II).

La sensibilidad, entendida como el valor de señal respuesta, es decir, como aumento de intensidad de fluorescencia, para una concentración de metal dada, y teniendo en cuenta el tiempo de respuesta a Hg (II) de los diferentes sensores desechables fabricados con los distintos plastificantes, aumentaba siguiendo el siguiente orden: éteres>ésteres carboxílicos>ésteres fosfato, concretamente NPOE>DOS>DOP>TEHP>TBP (100; 84; 46; 23; 7 en porcentaje). Puesto que NPOE y DOS ofrecían una respuesta similar a Hg (II), se

hizo un experimento considerando el tiempo de respuesta (Figura 6.2) y DOS fue seleccionado como plastificante para llevar a cabo los siguientes experimentos por ofrecer la respuesta más rápida con respecto a NPOE para una misma concentración de metal.

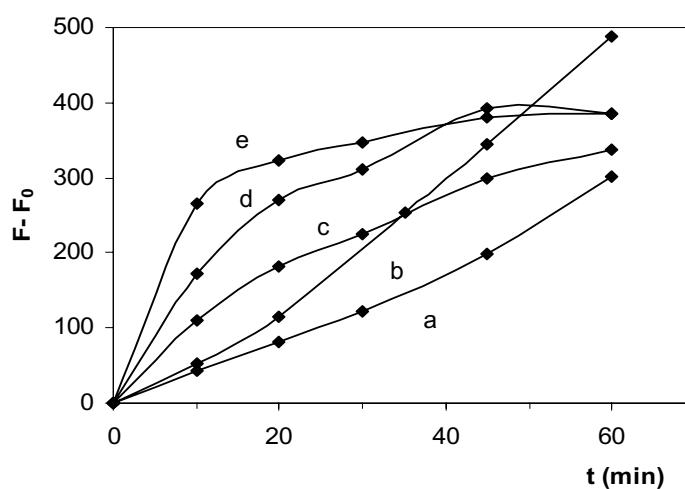


Figura 6.2. Cinéticas de respuesta del sensor para diferentes porcentajes de plastificante: a) 50% DOS; b) 68% NPOE; c) 60% DOS; d) 68% DOS; e) 80% DOS. $[Hg(II)] = 10^{-6}$ M. Con agitación vibratoria a $800 \text{ oscilaciones} \cdot \text{min}^{-1}$.

Para seleccionar el porcentaje de plastificante estudiamos el tiempo de respuesta y las propiedades físicas de diferentes membranas conteniendo distintas cantidades de DOS desde un 50 a un 80 % p/p (Figura 6.2). En estos experimentos, se midió la respuesta del sensor hacia una disolución 10^{-6} M de Hg (II) a diferentes tiempos de reacción mientras que se mantenía agitando la disolución problema con la tira reactiva en todo momento, excepto cuando iba a ser medida. El tiempo necesario para alcanzar el equilibrio ($t_{95\%}$) fue calculado para las diferentes membranas, obteniéndose los siguientes resultados: 57 minutos para el 50%; 51 minutos para el 60%; 39 minutos para el 68%, y 36 minutos para el 80%. Para porcentajes mayores al 80%, las propiedades físicas de la membrana empeoraban, se perdía homogeneidad y aumentaba el tiempo de secado considerablemente. Finalmente, un 80% de DOS y un 20% de PVC fueron seleccionados como porcentajes óptimos para preparar la membrana.

Con el objeto de optimizar la cantidad de luminóforo TPP, se prepararon seis tipos de membranas diferentes M1-M6 a partir de cócteles conteniendo 0,05; 0,10; 0,20; 0,30; 0,50 y 1,20 mg de TPP y el doble de moles de TCB en cada caso. Tres membranas de cada tipo fueron equilibradas en una disolución 10^{-6} M de Hg (II). La mayor diferencia expresada en intensidad de fluorescencia entre blanco (membrana en tampón) y analito (membrana en tampón más Hg (II)) se observó para las membranas de tipo M2 (Figura 6.3), por lo que se seleccionaron 0,10 mg de TPP para la preparación de los cócteles utilizados en los siguientes experimentos.

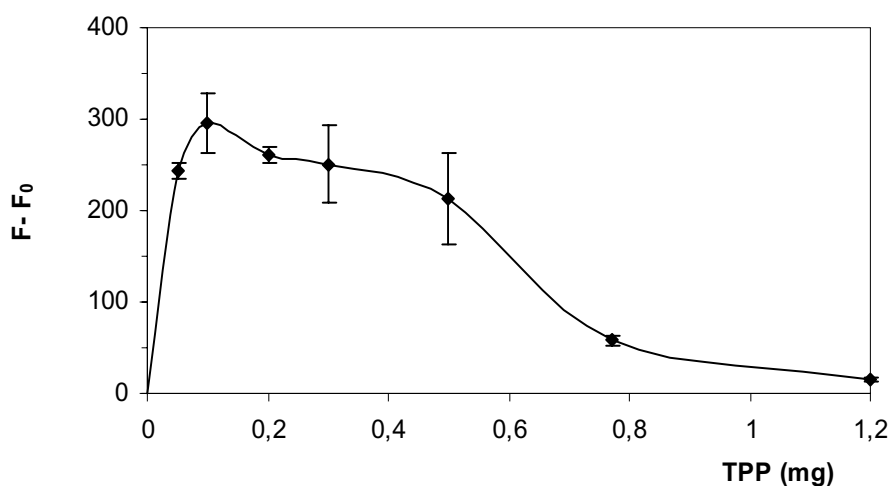


Figura 6.3. Influencia de la cantidad de TPP.

También se consideró la relación molar luminóforo/anión lipofílico a la hora de optimizar la composición de la membrana. Para ello, se prepararon membranas conteniendo relaciones molares 1:1, 1:2 y 1:3 y se probaron frente a una disolución 10^{-6} M de Hg (II), observándose que el aumento de fluorescencia crecía con la relación molar (83; 93; 100%), por lo que la relación molar 1:3 fue seleccionada como óptima.

La preparación de los sensores desechables se llevó a cabo mediante deposición y evaporación de un cierto volumen de una disolución conteniendo todos los componentes sobre un soporte de poliéster, originándose membranas con buenas características ópticas y mecánicas. El volumen mínimo de cóctel debe ser aquel que origine membranas de diámetro

y espesor adecuados, esto es, que asegure que el diámetro de la zona sensora sea ligeramente inferior al ancho de la tira de poliéster y superior al haz de radiación del espectrofotómetro y que la fluorescencia no sea excesivamente alta (15 μL en este caso). La reproducibilidad en la preparación de las membranas se calculó a partir de sus valores de intensidad de fluorescencia inicial y fue del 7% ($n=36$).

3.2.2. Parámetros de reacción

La respuesta de este sensor óptico desechable depende de la actividad protónica del medio, debido a la necesaria anulación de fluorescencia de la TPP por protonación de los dos nitrógenos del anillo heterocíclico, proceso facilitado por la presencia de la sal lipofílica en la membrana. La fluorescencia de las membranas desaparece a valores de pH inferiores a 4,0, aumentando por encima de este valor como es habitual en cualquier sistema controlado por un equilibrio ácido-base (Figura 6.4). De estos datos se deduce una estimación aproximada de la constante K considerando un único equilibrio de protonación ($K = K_{a3} \cdot K_{a4}$) que tiene un valor de $5,6 \cdot 10^{-8}$.

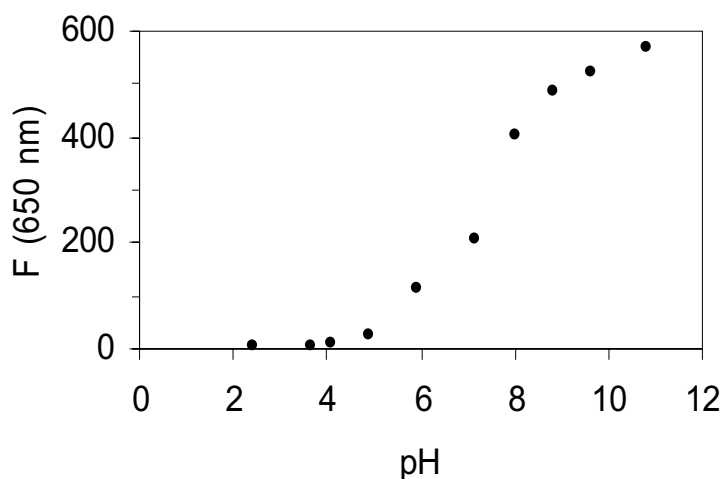


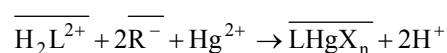
Figura 6.4. Dependencia de la intensidad de fluorescencia de la TPP con el pH.

Como pH de trabajo seleccionamos un valor de 2,4, originando resultados muy similares otros valores de pH inferiores a 4,0. Se probaron diferentes disoluciones tampón, tales como tampón fosfato, dicloroacetato, formiato, propionato y acetato. Finalmente se seleccionó un tampón ácido ortofosfórico/dihidrógeno fosfato de pH 2,4 y concentración 0,1 M para llevar a cabo los experimentos, por los buenos resultados y menor interferencia que produjo.

El tiempo de respuesta del sensor era largo, debido a que la etapa que limita el tiempo de reacción no es solo la de difusión del ión metálico en el interior de la fase orgánica plastificada y la reacción en membrana, sino también la extracción convectiva de masa desde el seno de la disolución hasta la membrana. Con el objeto de incrementar la velocidad de respuesta del método fue necesario agitar la disolución conteniendo la tira reactiva para facilitar el transporte de mercurio desde el seno de la disolución hasta la superficie del sensor. Se ensayaron diferentes métodos de agitación (agitador magnético, rotatorio, vibratorio y ultrasonidos) y se encontró que los mejores resultados en cuanto a coloración más homogénea de la zona sensora y por lo tanto mayor reproducibilidad, se lograron usando un agitador vibratorio operando a 800 oscilaciones por minuto. De los experimentos llevados a cabo para seleccionar el porcentaje óptimo de DOS (Figura 6.2), se seleccionaron 15 minutos como tiempo de reacción ya que para este tiempo se ha alcanzado el 80% de la señal máxima, lo que supone un compromiso entre sensibilidad y rapidez.

3.3. Mecanismo de respuesta

La respuesta del sensor propuesto frente a la actividad de mercurio se estudió para actividades comprendidas entre $9,3 \cdot 10^{-12}$ M y $9,2 \cdot 10^{-5}$ M ($1,0 \cdot 10^{-11}$ M y $1,0 \cdot 10^{-4}$ M en concentraciones) a pH 2,4. De acuerdo con los datos experimentales obtenidos, proponemos que el sensado de mercurio se pueda describir mediante la siguiente reacción global, si aceptamos que L y R⁻ representan al luminóforo y al anión tetraarilborato, respectivamente y X es un producto de descomposición de R⁻:



Las especies barradas se encuentran en fase membrana y las demás se encuentran en disolución acuosa. La Figura 6.5 (curva d) muestra un buen ajuste de este modelo (caracterizado por la ec. 6.2) a los datos experimentales.

$$a_{\text{Hg}^{2+}} = \frac{C_L \cdot \alpha \cdot a_{\text{H}^+}^2}{(1-\alpha) \cdot C_L \cdot (C_R - C_L \alpha)^2 \cdot K_e} \quad (6.2)$$

El ajuste por mínimos cuadrados de los datos experimentales al modelo teórico, en la zona de máxima pendiente de la curva respuesta para Hg (II), nos permite estimar un valor para el log Ke de $6,5 \pm 0,1$.

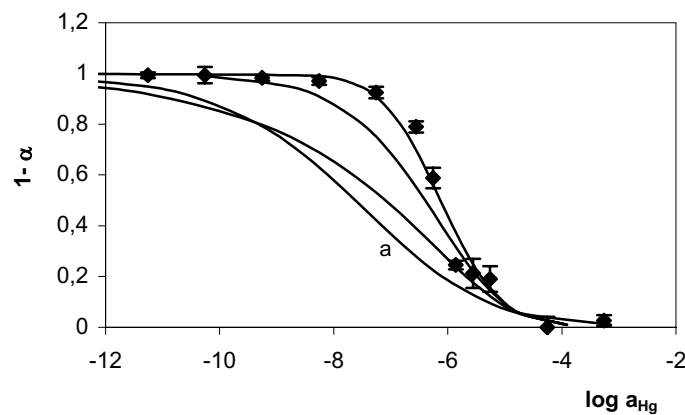
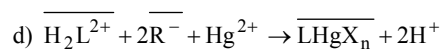
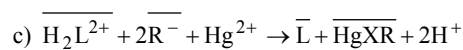
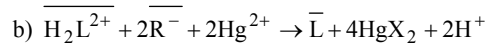
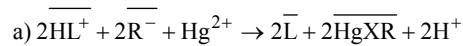


Figura 6.5. Respuesta del sensor a Hg (II). Círculos: datos experimentales con barras de error. Líneas: curvas respuesta teóricas de acuerdo con:



Asumimos que los iones Hg (II) entran en la membrana por intercambio iónico, lo que puede deducirse de la intensa interferencia producida por los aniones cloruro, que formarían la especie no disociada HgCl_2 imposibilitando así el intercambio iónico entre la disolución y

la membrana, y teniendo en cuenta que Montequi et al. observaron que la descomposición del anión tetraarilborato en disolución acuosa tiene lugar con Hg (II) en forma de HgCl_2 originando así principalmente $\text{HgCl}(\text{C}_6\text{H}_5)$ [28]. A continuación, el Hg (II) reacciona en la membrana con el anión tetraarilborato para producir un derivado organomercurial asociado a la porfirina. Suponemos que la descomposición del tetraarilborato ocurre en fase membrana y no en la interfase disolución acuosa-membrana por la falta de ajuste de los datos experimentales al modelo teórico que implica la formación de monofenilmercurio o difenilmercurio (curva b en Figura 6.5) en disolución acuosa, además de por la interferencia producida por cloruro anteriormente comentada.

En nuestro caso, encontramos que la descomposición del anión tetraarilborato lipofílico no implica la formación de un complejo mercurio-porfirina, debido a la lenta velocidad de formación de la metaloporfirina [35] como consecuencia de la dificultad de deformar el anillo porfirina para formar un complejo “sitting-atop” como es habitual en metales de transición de gran tamaño como es el mercurio [36]. Sin embargo, Chang et al. [37] afirman que el proceso de formación del complejo mercurio-TPP en membrana de PVC plastificada es rápido (4 minutos) a pH 8,0. Estos autores adscriben el mecanismo de sensado a un proceso de intercambio iónico entre dos protones de la forma base libre de la TPP (correspondientes a las constantes K_{a1} y K_{a2}) y Hg (II). Por otra parte, una segunda razón que apoya la no formación de un complejo mercurio-porfirina en nuestra membrana es que nosotros observamos un aumento concomitante de intensidad de fluorescencia cuando aumenta la concentración de Hg (II), mientras que Chang et al. [37] observan una atenuación en la intensidad de fluorescencia debido a la formación del complejo mercurio-porfirina, atenuación que usan como parámetro analítico.

Como producto de la reacción con mercurio, aceptamos la formación de una asociación que incluye la forma base libre de la porfirina TPP y un producto derivado de la descomposición del anión tetraarilborato, mientras que ningún otro modelo que suponga la presencia diferenciada de la porfirina libre y de un producto de descomposición se ajusta a los datos experimentales encontrados (curvas a y c en Figura 6.5).

3.4. Parámetros analíticos

Se probaron dos tipos de funciones de calibrado diferentes para el sensor desechable propuesto, una basada en la función respuesta tipo sigmoide definida por la ec. 6.2 y otra función lineal que respondía a bajas concentraciones de Hg (II).

Para definir y caracterizar la función de calibrado basada en la relación logarítmica existente entre $1-\alpha$ y Hg (II), se prepararon dos series de patrones, una serie en la zona de máxima pendiente (3 patrones, 3 réplicas de cada uno), entre $2,8 \cdot 10^{-7}$ y $1,4 \cdot 10^{-6}$ M en actividades y otra serie en la zona de mínima pendiente de actividad más baja (4 patrones, 3 réplicas de cada uno), entre $5,5 \cdot 10^{-12}$ y $5,5 \cdot 10^{-8}$ M en actividades. Para cada una de las réplicas se usó en cada ocasión una tira diferente. La linealidad de cada serie se comprobó aplicando un test de fallo de ajuste [38], y las funciones lineales obtenidas fueron las siguientes: $1-\alpha = -0.7822 - 4.329 \cdot \log a_{\text{Hg}}$ y $1-\alpha = -0.008 + 0.9069 \log a_{\text{Hg}}$. El límite de detección obtenido de la intersección de ambas funciones es $0,2 \mu\text{M}$ en actividad ($0,3 \mu\text{M}$ en concentración; $63 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) (Figura 6.6). Como límite superior del rango de medida se usó la mayor concentración que se ajusta estadísticamente a la función lineal; esta fue de $2,9 \mu\text{M}$ ($5,3 \mu\text{M}$ en concentración). Por ello, el rango de medida está comprendido entre $0,3$ y $5,3 \mu\text{M}$ (en concentraciones).

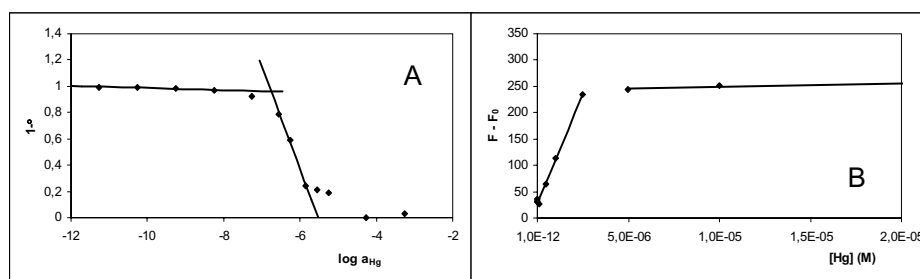


Figura 6.6. Función de calibrado para Hg (II): a) función logarítmica definida por la ec. 6.2; b) función lineal.

La precisión expresada como repetibilidad sensor a sensor con diferentes sensores desechables, expresada como desviación estándar relativa, se obtuvo a dos niveles de

actividad comprendidos en el rango dinámico lineal: 0,4 y 1,4 μM usando ocho réplicas de cada uno. Los valores de DER obtenidos fueron 0,36 y 1,04 % expresados en términos de $\log a_{\text{Hg}^{2+}}$ (Tabla 6.1).

Tabla 6.1. Parámetros analíticos.

Parámetro (valor; S)	Calibración	
	Logarítmica	Lineal
Ordenada en el origen	-4,3; 0,2	29,1; 2,1
Pendiente	-0,78; 0,04	$8,2 \cdot 10^7$; $1,9 \cdot 10^6$
Nivel de probabilidad % (lack-of-fit test)	15,4	5,9
Límite inferior (μM)	0,3	0,1
Rango lineal (μM)	0,3 – 5,3	0,1 – 2,6
DER (%) Intersensor	0,36 ^a (0,40 μM^{b})	23,9 ^c (0,25 μM^{d})
	1,04 ^a (1,40 μM^{b})	6,5 ^c (2,5 μM^{d})
Estabilidad	1,5 meses	
Coste	0,16 €/tira	

a: DER para $\log a_{\text{Hg}^{2+}}$, b: actividades, c: DER para [Hg (II)], d: concentraciones.

Se puede utilizar una relación lineal con objeto de calibrar utilizando como parámetro analítico la diferencia en intensidad de fluorescencia entre las membranas que han estado en contacto con Hg (II) y el blanco ($F-F_0$). La Figura 6.6 muestra la variación de $F-F_0$ con la concentración de Hg (II) entre 10^{-4} y 10^{-11} M, esta se compone de dos tramos rectos, de los que se puede utilizar el de menor concentración como función analítica ($F-F_0 = 8,2 \cdot 10^7 [\text{Hg(II)}] + 29,1$). El límite de detección calculado a partir de $3 \cdot \text{SD}(\text{blanco})/\text{pendiente}$ de acuerdo con la definición de la IUPAC, fue de $0,1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($25 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) de Hg (II). El límite superior se calculó a partir del punto de intersección de la anterior función de calibrado con la función establecida en la zona independiente de la concentración de mercurio ($F-F_0 = 6,5 \cdot 10^5 [\text{Hg(II)}] + 242,9$). De acuerdo con esto, el rango dinámico lineal para la determinación de mercurio en disolución acuosa cubría el intervalo de concentraciones comprendidas entre $0,1$ y $2,6 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Hg (II) (25 y $528 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$). La precisión expresada como DER se calculó a dos niveles de concentración de mercurio comprendidos en el rango dinámico lineal ($0,25$ y $2,5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) y para 8 réplicas de cada uno de ellos. Los valores de

DER obtenidos fueron 23,9 y 6,5 % expresados en términos de [Hg(II)] (Tabla 6.1). Para determinar la estabilidad del sensor irreversible propuesto se preparó un conjunto de tiras reactivas, que fueron almacenadas protegiéndolas de la luz y de la humedad excesiva, y se evaluó su respuesta en el tiempo para una concentración de Hg (II) situada en la mitad del rango dinámico lineal; de esta forma se comprobó que las tiras eran estables al menos durante mes y medio. La Tabla 6.1 nos muestra éstos y otros parámetros analíticos.

Comparando la membrana propuesta con otros sensores ópticos basados en el uso de principios o reactivos similares, podemos resaltar que los parámetros analíticos del sensor propuesto por nosotros son similares a los del sensor óptico descrito por Murkovic y Wolfbeis [39]; [21] en el que utilizan un esquema de flujo ($40\text{-}650\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), aunque el tiempo de reacción necesario (30 minutos) es superior que en nuestro caso; análogamente, el procedimiento propuesto por Chan et. al [37] previamente citado, responde entre 40 y $9000\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, aunque este dato no se refiere al rango dinámico lineal, sino al rango global de concentraciones estudiadas.

Los resultados obtenidos por nosotros se pueden comparar con los de otros sensores desechables ópticos o visuales descritos hasta el momento. Por ejemplo, el procedimiento rápido propuesto para Hg(II) basado en p-fenilazo-3-aminorodanina inmovilizada en una fibra de poliacrilonitrilo rellena con una resina catiónica finamente dispersada fue propuesta para un rango de concentraciones de 50 a $500\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ [40]. El método rápido basado en tiodina contenida en una membrana de policaproina se ha descrito entre 40 y $2000\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ [6]. La tira reactiva propuesta para determinar Hg (II) basada en la inhibición de ureasa por este metal presenta un rango de respuesta que va desde 0,2 a $200\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ [8].

Con el fin de examinar los efectos producidos por posibles especies interferentes, tales como iones alcalinos, alcalinotérreos, otros metales pesados y algunos aniones, en la respuesta del sensor, se escogió una concentración de $0,28\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Hg (II). Las especies seleccionadas fueron ensayadas a varios niveles de concentración y si tenía lugar interferencia, se disminuía la concentración de la especie en cuestión hasta que produjera un error inferior al 5% en la determinación de analito, concentración que definimos como tolerancia. De las distintas especies estudiadas ninguna producía un gran efecto sobre la

respuesta del sensor a Hg (II) exceptuando los iones cloruro que debido a la formación del complejo anteriormente discutido, sí producían interferencia (tabla 6.2).

Tabla 6.2. Efecto de las posibles especies interferentes en la respuesta del sensor. [Hg (II)]= 0,28 mg·L⁻¹.

Interferente	Tolerancia (mg·L ⁻¹)
Mg (II)	>60.0*
Ca (II)	>140.0*
Na (I)	1500.0
K (I)	>4.0*
Pb (II)	>2.0*
Fe (III)	>2.0*
Fe (II)	>2.0*
Ni (II)	>2.0*
Zn (II)	>2.0*
Cu (II)	>2.0*
Cd (II)	>2.0*
Mn (II)	>2.0*
Co (II)	>2.0*
Cl ⁻	0.5
NO ₃ ⁻	>200.0*
SO ₄ ²⁻	250.0
PO ₄ ³⁻	6100.0

* Concentración máxima ensayada

4. Conclusiones

Se ha desarrollado un sensor óptico de un solo uso irreversible para determinar mercurio utilizando como reacción de reconocimiento selectiva la descomposición de un

anión tetraarilborato lipofílico presente en la membrana inducida por mercurio y como transductor óptico un fluoroionóforo selectivo a protones que pierde su intensidad de fluorescencia por protonación. El sensor desechable se ha preparado en una membrana transparente que funciona por intercambio iónico y ofrece una forma fácil de medir la señal analítica. El carácter irreversible de la reacción de mercurio con la membrana sensora que contiene los reactivos no impide su uso como sensor desechable para la determinación de mercurio. Todos los reactivos necesarios se encuentran contenidos en la membrana sensora y por lo tanto para la determinación de mercurio solo necesitamos tamponar la disolución problema.

Los inconvenientes que presenta el sensor propuesto son la interferencia debida a cloruro y el tiempo de respuesta, que para el formato desarrollado es de unos 15 minutos debido a la difusión y reacción dentro de la membrana polimérica, aunque podría reducirse usando soportes porosos.

Agradecimientos

Agradecemos la financiación al Ministerio de Educación y Cultura, Dirección General de Enseñanza Superior (Proyecto N° BQU2002-00353).

Bibliografía

- [1] E. Merian, *Metals and Their Compounds in the Environment*, VCH, Weinheim, 1991.
- [2] R.P. Mason, J.R. Reinfelder, F.M.M. Morel, *Water Air Soil Poll.* 80 (1995) 915-921.
- [3] C.T. Costley, K.F. Mossop, J.R. Dean, L.M. Garden, J. Marshall, J. Carroll, *Anal.Chim.Acta* 405 (2000) 179-183.
- [4] W.L. Clevenger, B.W. Smith, J.D. Winefordner, *Crit.Rev.Anal.Chem.* 27 (1997) 1-26.
- [5] A.V. Yallouz, *Fresenius J.Anal.Chem.* 366 (2000) 461-465.
- [6] R.F. Gur'eva, S.B. Savvin, *J.Anal.Chem.* 58 (2003) 990-994.
- [7] L.F. Capitán-Vallvey, C. Cano-Raya, E. Lopez Lopez, M.D. Fernandez Ramos, *Anal.Chim.Acta* 524 (2004) 365-372.
- [8] G.-Q. Shi, G. Jiang, *Anal.Sci.* 18 (2002) 1215-1219.
- [9] S.V. Muginova, N.A. Akovbyan, T.N. Shekhovtsova, *J.Anal.Chem.* 54 (1999) 569-573.
- [10] I.A. Veselova, I.F. Dolmanova, S.V. Muginova, T.N. Shekhovtsova, *J.Anal.Chem.* 57 (2002) 1120-1128.
- [11] D.A. Blake, R.C. Blake II, M. Khosraviani, A.R. Pavlov, *Anal.Chim.Acta* 376 (1998) 13-19.
- [12] M. Virta, J. Lampinen, M. Karp, *Anal.Chem.* 67 (1996) 667-669.
- [13] H. Flaschka, F.S. Sadek, *Chemist-Analyst* 47 (1958) 30-31.

-
- [14] H. Huber, H. Raber, K. Dvorak, K. Kalcher, *Mikrochim.Acta* 1 (1982) 155-158.
- [15] S.C. Su, M.H. Chang, C.L. Chang, P.C. Chang, S.S. Chou, *Yaowu Shipin Fenxi* 11 (2003) 114-127.
- [16] R. Montequi, A. Doadrio, C. Serrano, *An.R.Soc.Esp.Fis.Quim.* 53 (1957) 447-452.
- [17] R. Montequi, A. Doadrio, C. Serrano, *An.R.Soc.Esp.Fis.Quim.* 54B (1957) 29-34.
- [18] Y. Cai, S. Monsalud, R. Jaffe, R.D. Jones, *J.Chromatog.A* 876 (2000) 147-155.
- [19] Y.C. Sun, Y.T. Chung, M.H. Yang, *Anal.Commun.* 34 (1997) 333-334.
- [20] I. Svancara, K. Vytras, C. Hua, M.R. Smyth, *Talanta* 39 (1992) 391-396.
- [21] I. Murkovic, O.S. Wolfbeis, *Sens.Actuators B: Chem.* B39 (1997) 246-251.
- [22] L.F. Capitán-Vallvey, P. Alvarez de Cienfuegos, M.D. Fernández-Ramos, R. Avidad-Castañeda, *Sens.Actuators B: Chem.* 71 (2000) 140-146.
- [23] L.F. Capitán-Vallvey, O.M.A. Al-Barbarawi, M.D. Fernández-Ramos, R. Avidad-Castañeda, V. Ramirez Gonzalez, *Analyst* 125 (2000) 2000-2005.
- [24] K. Seiler, W. Simon, *Anal.Chim.Acta* 266 (1992) 73-87.
- [25] L.F. Capitán-Vallvey, M.D. Fernández-Ramos, P. Alvarez de Cienfuegos, *Anal.Chim.Acta* 451 (2002) 231-241.
- [26] P.C. Meier, *Anal.Chim.Acta* 136 (1982) 363-368.
- [27] G. Wittig, P. Raff, *Ann.* 573 (1951) 195-209.
- [28] R. Montequi, A. Doadrio, C. Serrano, *Publ.Inst.Quim.Alonso Barba (Madrid)* 10 (1956) 183-188.
- [29] A. Stone, E.B. Fleischer, *J.Am.Chem.Soc.* 90 (1968) 2735-2748.
- [30] J.B. Kim, J.J. Leonard, F.R. Longo, *J.Am.Chem.Soc.* 94 (1972) 3986-3992.
- [31] J.I. Itoh, T. Yotsuyanagi, K. Aomura, *Anal.Chim.Acta* 74 (1975) 53-60.

-
- [32] D.J. Quimby, F.R. Longo, *J.Am.Chem.Soc.* 97 (1975) 5111-5117.
- [33] J. Janata, M. Josowicz, P. Vanysek, D.M. Denvany, *Anal.Chem.* 70 (1998) 179R.
- [34] T. Rosatzin, E. Bakker, K. Suzuki, W. Simon, *Anal.Chim.Acta* 280 (1993) 197-208.
- [35] M. Biesaga, K. Pyrzynska, M. Trojanowicz, *Talanta* 51 (2000) 209-224.
- [36] M. Tabata, M. Tanaka, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 10 (1991) 128-133.
- [37] W.H. Chan, R.H. Yang, K.M. Wang, *Anal.Chim.Acta* 444 (2001) 261-269.
- [38] Analytical Methods Committee, *Analyst* 119 (1994) 2363-2366.
- [39] G.J. Mohr, I. Murkovic, F. Lehmann, C. Haider, O.S. Wolfbeis, *Sens.Actuators B: Chem.* 39 (1997) 239-245.
- [40] S.B. Savvin, L.M. Trutneva, O.P. Shvoeva, K.A. Efendieva, *Zh. Analit. Khim.* 46 (1991) 709-713.

CAPÍTULO 7
ATENUACIÓN DE
FLUORESCENCIA DEL COMPLEJO
EUROPIO-TETRACICLINA-
PERÓXIDO DE HIDRÓGENO POR
COBRE Y OTROS IONES
METÁLICOS

ATENUACIÓN DE FLUORESCENCIA DEL COMPLEJO EUROPIO-TETRACICLINA-PERÓXIDO DE HIDRÓGENO POR COBRE Y OTROS IONES METÁLICOS

Resumen

El complejo europio-tetraciclina presenta intensidad de fluorescencia débil con máximo de emisión a 615 nm. Por adición de peróxido de hidrógeno (HP), se forma el complejo ternario Eu(Tc)(HP), que es fuertemente fluorescente, siendo su intensidad luminiscente 15 veces mayor a la del complejo binario Eu(Tc). En este capítulo estudiaremos la atenuación de fluorescencia del complejo Eu(Tc)(HP) producida por la presencia de cobre y otros iones metálicos tales como Fe (III), Ag (I), Al (III), Zn (II), Co (II), Ni (II), Mn (II), Ca (II) y Mg (II). La especie Cu (II) provoca atenuación dinámica y estática, procesos que son cuantificados mediante el cálculo de sus respectivas constantes. Las medidas de tiempo de vida fueron llevadas a cabo utilizando la técnica de Determinación Rápida de Tiempos de vida (RLD) y también utilizando la técnica Time Correlated Single Photon Counting (TCSPC).

En este capítulo se propone un método basado en la medida de intensidad de fluorescencia a tiempo resuelto para la determinación de cobre en agua. El método responde linealmente a concentraciones de Cu (II) comprendidas entre $0,2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ y $1,6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

1. Introducción

Los complejos de Eu (III) con diferentes ligandos orgánicos son prometedores candidatos como sondas luminiscentes y marcadores para sistemas biomoleculares y han sido extensamente estudiados durante más de 25 años [1]. El marcado (inmuno)histoquímica es actualmente un importante método que es ampliamente utilizado para explorar muestras de tejido o cultivos celulares para interacciones biomoleculares [2]. El uso de quelatos de europio como etiquetas para proteínas y anticuerpos, con sus excepcionales propiedades como son largos tiempos de vida del orden de los μs , sus grandes desplazamientos Stokes de más de 200 nm y emisión tipo línea, han proporcionado técnicas de detección resueltas en el tiempo que se han establecido en bioanálisis como fluoroinmunoensayos resueltos en el tiempo (TRFIA) [3-8]. Los complejos de lantánidos funcionalizados han sido usados también como marcadores de ADN y proteínas, aplicables como donores en ensayos basados en transferencia de energía de resonancia (RET) en tiempo resuelto [9-11]. Las medidas a tiempo resuelto permiten suprimir la señal de fondo (ruido) mediante la recogida de la señal de fluorescencia emitida dentro de unos intervalos de tiempo en el en el rango de los μs , mientras que el tiempo de decaimiento de autofluorescencia de otras especies biológicas se encuentra en el rango de los ns.

El mecanismo de sensibilización comúnmente observado para complejos luminiscentes de Europio implica una vía triplete. La transferencia de la energía absorbida por el ligando a el Eu (III) tiene lugar desde el estado triplete del ligando excitado (T_1). La ventana de excitación óptica esta limitada a longitudes de onda inferiores a 380 nm [12]. Con el uso de cromoforos “antena” como ligandos, que presentan una pequeña diferencia de energía entre el estado excitado singlete mas bajo (S_1) y el estado T_1 , la longitud de onda de excitación se puede desplazar a la región visible. Además, la emisión de Eu (III) a largas longitudes de onda se puede conseguir debido a una vía singlete, por la que la energía del estado S_1 del cromóforo es directamente transferida a los estados luminiscentes del centro europio [13].

Se sabe que la tetraciclina actúa como un ligando antena de los iones europio [14]. El complejo Eu (III)-tetraciclina puede enlazar con peróxido de hidrógeno (HP) para formar un complejo ternario fuertemente fluorescente Eu(Tc)(HP) que presenta un máximo de

absorción entorno a los 400 nm. La adición de peróxido de hidrógeno al complejo [Eu(Tc)] induce un aumento de 15 veces en la intensidad de luminiscencia a $\lambda_{em} = 615$ nm, debido a la sustitución de una molécula de agua ligando y formación de un peroxo complejo [15]. En el caso de un radio molar Eu:Tc 3:1 el aumento en la intensidad de luminiscencia se acompaña de un incremento en el tiempo de vida medio τ desde 30 μ s a 60 μ s. Ambos complejos pueden ser excitados con un LED azul ($\lambda = 405$ nm). Los iones Eu (III) pueden aportar ocho o nueve sitios de coordinación a la hora de formar de complejos [1,16]. Ambos complejos [Eu(Tc)] y [Eu(Tc)(HP)] muestran las bandas de absorción y emisión típicas de los complejos lantánido-ligando. La banda de absorción de estos complejos (con picos a $\lambda_{exc} = 398$ y 405 nm) viene dada por la presencia del ligando tetraciclina que, en su forma no complejada, presenta un espectro de absorción muy parecido. Como en otros complejos de este tipo la energía fotónica absorbida por el ligando es transferida desde el estado triplete del ligando al ión central Eu (III) dando lugar a su típico espectro de emisión [17,18] formado por una banda principal con un pico agudo a $\lambda_{em} = 615$ nm ($^5D_0 \rightarrow ^7F_2$) y varias bandas secundarias centradas a 579, 597, 654 y 688 nm ($^5D_0 \rightarrow ^7F_{0,4}$), lo que refleja la baja simetría del centro Eu (III).

La respuesta reversible de la emisión fluorescente puede ser aplicada en sensores ópticos para peróxido de hidrógeno [19], glucosa [20] y para la determinación de actividades enzimáticas asociadas con la producción de peróxido de hidrógeno (por ejemplo por oxidasas) [21], o consumo (por peroxidasa o catalasa) [22,23], empleando técnicas de detección fluorescente en tiempo resuelto o de imagen.

Se ha reportado que la intensidad de luminiscencia de iones europio fijados en películas de carboximetil celulosa puede ser atenuada por cobre, originando también un tiempo de vida mas corto [24]. Se ha observado un comportamiento análogo para complejos de europio con ligandos terpiridilo en disolución [25]. El método de atenuación parece adecuado para la determinación de cobre en muestras de agua ambiental o de grifo, aunque las interferencias producidas por la presencia de otros iones metálicos es inherente. En este capítulo se estudia la atenuación de fluorescencia del complejo Eu(Tc)(HP) producida por los iones Cu (II) y otra serie de iones metálicos. Se han estudiado todas las variables experimentales que pueden influir en el proceso de atenuación y se han analizado los

mecanismos asociados. Los parámetros fueron optimizados para la determinación del ión cobre (II) en ensayos basados en el uso de un lector de microplacas, lo que nos permite una detección rápida y paralela de un gran número de muestras usando lectores de fluorescencia en tiempo resuelto o sistemas de imagen.

2. Experimental

2.1. Reactivos y materiales

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico y el agua utilizada procedía de un equipo de ósmosis inversa (Milli-Ro 12 acoplado a un equipo Milli Q de Millipore Corp). La disolución madre de cobre ($1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) se preparó por pesada exacta de sulfato de cobre pentahidrato, y posterior dilución con agua. Las disoluciones madre de los demás iones metálicos conteniendo cada una $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Fe (III), Ag (I), Al (III), Zn (II), Co (II), Ni (II), Mn (II), Ca (II) y Mg (II) se prepararon a partir de cloruro de Fe (III) hexahidrato, sulfato de Ag (I), nitrato de Al (III) nonahidrato, cloruro de Zn (II), cloruro de Co (II) hexahidrato, sulfato de Ni (II) hexahidrato, sulfato de Mn (II) monohidrato, cloruro de Ca (II) dihidrato y sulfato de Mg (II) heptahidrato (todos ellos de Merck, Darmstadt, Alemania). Las disoluciones más diluidas se prepararon a partir de las disoluciones madre por dilución con tampón MOPS 10 mM.

El tampón MOPS 10 mM se preparó a partir de ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico y 3-(N-morfolino)propanosulfonato sódico (Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, Alemania). El pH de 6,9 se ajustó por adición de disolución de ácido clorhídrico (Merck).

La disolución madre de EuTc (0,21 mM) se preparó disolviendo las cantidades exactas de cloruro de Eu (III) hexahidrato (Alfa Products, Danvers, MA; www.alfa.com) y clorhidrato de tetraciclina (Sigma) en tampón MOPS 10 mM para tener una concentración final 0,21 M en Eu (III) y en Tc.

2.2. Instrumentación y software

Se utilizó un espectrofluorímetro Aminco-Bowman Series 2 (SLM-Aminco, Rochester, NY) equipado con una lámpara de xenon de 150 W como fuente de radiación. La fluorescencia fue excitada a 405 nm y la emisión se recogió a 616 nm. Todos los experimentos se llevaron a cabo a 25°C.

Las intensidades de luminiscencia en la placa de 96 pocillos fue registrada con un lector de microplacas Tecan Genios Plus excitando a 405 nm y registrando la emisión a 612 nm en presencia de diferentes concentraciones de iones metálicos.

La configuración para el sistema de imagen ha sido descrita en detalle en publicaciones previas [19,20] y consiste en una cámara CCD de muestreo rápido (Imagex TGi, Photonic Research Systems, London, GB), una serie de LED pulsables con 96 diodos emisores de luz UV ($\lambda_{\text{max}} = 405$ nm, Roithner Laser Technik, Viena; ver: www.roithner-laser.com), un generador de pulsos (Scientific Instruments DG 535), filtros ópticos para la excitación (BG 12; Schott) y emisión (KV 550; Schott) y un ordenador personal para el control y visualización de los experimentos

El decaimiento de los tiempos de vida se registró con un espectrómetro OB 920 (Edinburgh Instruments) equipado con una lámpara de microsegundos μF 900-HP y como sistema de detección un fotomultiplicador de fotón único S900. Para el tratamiento estadístico de los datos fue utilizado el paquete informático Statgraphics (Manugistics Inc. y Statistical Graphics Corporation, USA, 1992), ver.6.0 STSC Inc. Statistical Graphics Corporations, USA, 1993.

2.3. Procedimiento

Se coloca una alícuota de una disolución patrón conteniendo entre 0,2 y 1,6 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de cobre o de otro ión metálico en una matraz de 10 mL que contiene 10 μM del complejo EuTc (0,5 mL de una disolución 0,2 mM de EuTc (1:1)) y 0,4 mM de H_2O_2 (0,8 mL de una disolución 5 mM de H_2O_2) y se enrasa con una disolución tampón de pH 6,9 de MOPS 10 mM. Posteriormente, la disolución se deposita en una microplaca de 96 pocillos a razón de 200 μL por pocillo y se esperan 30 minutos antes de medirla. La intensidad de fluorescencia

en tiempo resuelto fue determinada en un lector de microplacas fijando una longitud de onda de excitación de 405 nm y una longitud de onda de emisión de 612 nm con un tiempo de retraso de 60 μ s después de la excitación y un tiempo de integración de 40 μ s. Todas las medidas se llevaron a cabo a 25°C.

En el caso de las muestras además de la disolución patrón, disolución de EuTc y disolución de H₂O₂, se pone un volumen de muestra comprendido entre 25 y 800 μ L, dependiendo del tipo de muestra para aplicar el método de adición de patrón. Una vez preparadas las disoluciones se opera de igual forma que con los patrones.

2.4. Procedimiento de referencia

Como procedimiento de referencia se utilizó la determinación fotométrica basada en el agente quelante dietilditiocarbamato sódico trihidrato (ensayo para cobre Merck, VWR International, Darmstadt, Germany).

3. Resultados y discusión

3.1. Fundamento teórico

Como ya comentamos en el capítulo segundo de esta Memoria de Doctorado la atenuación de fluorescencia se refiere a cualquier proceso capaz de disminuir la intensidad de fluorescencia de una determinada especie [26]. A continuación destacaremos las expresiones matemáticas más importantes utilizadas en este capítulo para el cálculo de las distintas constantes de atenuación.

La atenuación dinámica o colisional se origina como consecuencia de choques entre el fluoróforo y la molécula atenuadora. En el caso de la atenuación estática, se forma un complejo no fluorescente entre el fluoróforo y el atenuador. La atenuación colisional de fluorescencia viene descrita por la siguiente ecuación de Stern-Volmer:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_q \tau_0 [Q] = 1 + K_D [Q] \quad (7.1)$$

En esta ecuación, F_0 y F son las intensidades de fluorescencia del fluoróforo en ausencia y en presencia del atenuador, respectivamente, K_q es la constante de atenuación bimolecular, τ_0 es el tiempo de vida del fluoróforo en ausencia del atenuador y $[Q]$ es la concentración del atenuador.

La atenuación estática también puede dar lugar a una representación de Stern-Volmer lineal:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_S[Q] \quad (7.2)$$

La dependencia de F_0/F con la $[Q]$ es lineal e idéntica a la observada para la atenuación dinámica con la diferencia de que la constante de atenuación en este caso es la constante de asociación del complejo.

Una característica importante de la atenuación dinámica es su disminución equivalente en intensidad de fluorescencia F y en tiempo de vida τ :

$$\frac{F_0}{F} = \frac{\tau_0}{\tau} \quad (7.3)$$

Por lo tanto:

$$\frac{\tau_0}{\tau} = 1 + K_q \tau_0 [Q] = 1 + K_D [Q] \quad (7.4)$$

La medida de tiempos de vida de fluorescencia es la mejor opción para discernir entre atenuación estática y dinámica ya que se cumple que para la atenuación estática $\tau_0/\tau=1$. En muchos casos el fluoróforo puede ser atenuado tanto por colisiones como por formación de complejo con el mismo atenuador. El rasgo característico de las representaciones de Stern-Volmer en tales circunstancias es una curvatura hacia arriba, cóncava hacia el eje y. En este caso la dependencia de la intensidad de fluorescencia con la concentración de atenuador es:

$$\frac{F_0}{F} = (1 + K_D [Q])(1 + K_S [Q]) \quad (7.5)$$

Multiplicando los términos entre paréntesis resulta:

$$K_{app} = \left(\frac{F_0}{F} - 1 \right) \frac{1}{[Q]} = (K_D + K_S) + K_D K_S [Q] \quad (7.6)$$

Una representación de K_{app} frente a $[Q]$ origina una línea recta de ordenada en el origen $K_D + K_S$ y pendiente $K_D K_S$. Los valores para cada una de las constantes se calculan a partir de las dos soluciones de la ecuación cuadrática obtenida. La porción dinámica de la atenuación observada se podría determinarse por medida de tiempos de vida. Esto es $\tau_0/\tau = 1 + K_D [Q]$ y a partir de esta expresión se puede calcular el valor de K_D .

3.2. Parámetros experimentales

La presencia de cobre da lugar a una atenuación de fluorescencia del complejo $[Eu(Tc)(HP)]$ y no es atribuida a la descomposición catalítica del peróxido de hidrógeno. Si ocurriera una descomposición, la adición de iones $Cu(II)$ a una disolución de $[Eu(Tc)(HP)]$ debería generar un decrecimiento continuo de intensidad de fluorescencia con el tiempo, hasta alcanzar el bajo nivel de fluorescencia del complejo $[Eu(Tc)]$. Esto no se observó mediante medidas cinéticas. Los parámetros experimentales más importantes que pueden afectar al rendimiento cuántico de luminiscencia del complejo $[Eu(Tc)(HP)]$ son la relación molar $Eu:Tc$, el tiempo de equilibración, la concentración de $Eu(Tc)$ y de peróxido de hidrógeno, la fuerza iónica y el pH. Todos y cada uno de ellos fueron estudiados y optimizados.

Con objeto de optimizar la relación molar $Eu:Tc$ se prepararon disoluciones con diferentes relaciones molares (1:1; 2:1; 3:1 y 4:1). Cada relación molar fue ensayada frente a diferentes concentraciones de cobre. La mayor respuesta fue observada con la relación molar 1:1 $Eu:Tc$, que, en consecuencia, fue seleccionada para ulteriores experimentos. El ensayo con micropocillos en tiempo resuelto mostró la mayor respuesta y mejor reproducibilidad empleando un tiempo de retraso de 60 μs después de la excitación y un tiempo de integración de 40 μs , siguiendo la componente principal del perfil de decaimiento triexponencial del $[Eu(Tc)(HP)]$ [15].

El tiempo de reacción, tiempo transcurrido entre la preparación de la disolución y la medida de la misma, se varió entre 20 y 90 minutos, observando que la disminución de

fluorescencia debido a la atenuación por cobre alcanza un estado estacionario después de 30 minutos, por lo que este tiempo fue seleccionado.

Por variación de las concentraciones de $[\text{Eu}(\text{Tc})]$ y de peróxido de hidrógeno se encontró un rango dinámico óptimo para el ensayo de atenuación a una concentración $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de complejo $[\text{Eu}(\text{Tc})]$ y un exceso de peróxido de hidrógeno ($0,4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$).

La adición de diferentes concentraciones de cloruro sódico, comprendidas entre 50 y 1000 mM, no muestra una influencia apreciable de la fuerza iónica sobre las constantes de atenuación.

Por el contrario, la influencia del pH sobre el rendimiento cuántico de fluorescencia del complejo europeo tetraciclina es muy alta. Así, el efecto de valores de pH comprendidos entre 4 y 10 sobre las propiedades fluorescentes fue seguido para los complejos $[\text{Eu}(\text{Tc})]$ y $[\text{Eu}(\text{Tc})(\text{HP})]$ en ausencia y en presencia de iones $\text{Cu}(\text{II})$. La Figura 7.1 muestra que en todos los casos un pH entorno a 6,9 origina los mayores cambios en la intensidad de fluorescencia, por lo que todos los experimentos de atenuación se llevaron a cabo a pH 6,9 ajustado con disolución tampón 10 mM de MOPS de pH 6,9.

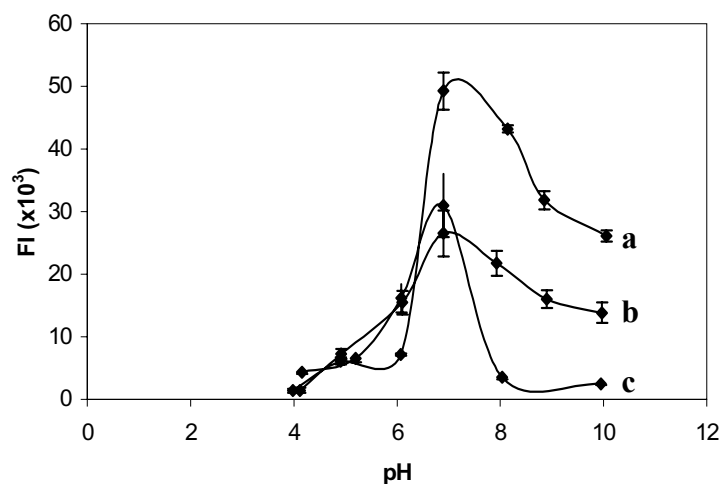


Figura 7.1. Influencia del pH en el rendimiento cuántico de los complejos de $\text{Eu}(\text{III})$. a) $\text{Eu}(\text{Tc})(\text{HP})$; b) $\text{Eu}(\text{Tc})(\text{HP}) + \text{Cu}(\text{II})$; c) $\text{Eu}(\text{Tc})$. $[\text{Eu}(\text{Tc})] = 10 \mu\text{mol L}^{-1}$; $[\text{HP}] = 0,4 \text{ mmol L}^{-1}$; $[\text{Cu}(\text{II})] = 2 \mu\text{mol L}^{-1}$.

3.3. Detección de la intensidad de luminiscencia

Se prepararon una serie de disoluciones del complejo [Eu(Tc)(HP)] conteniendo concentraciones de cobre entre 0,0025 y 40 μM con cuatro réplicas de cada una de ellas y se midió su intensidad de fluorescencia. Los resultados obtenidos se utilizaron para obtener una curva de calibración tipo Stern-Volmer, representando gráficamente $(F_0/F)-1$ frente a la [Cu (II)], (Figura 7.2), siendo F_0 el valor de intensidad de fluorescencia de una disolución sin cobre y F el valor de intensidad de fluorescencia de las diferentes disoluciones con cobre.

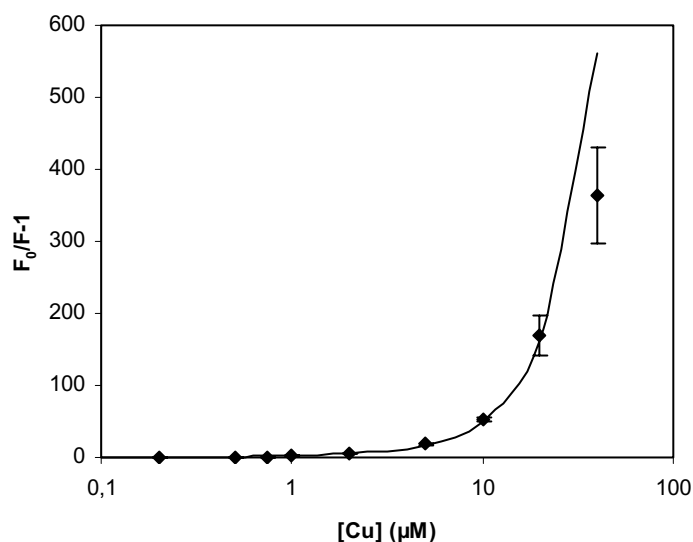


Figura 7.2. Representación de Stern-Volmer: $(F_0/F)-1$ vs. [Cu(II)]. Cuatro réplicas en cada caso.

A partir de la Figura 7.2 se puede deducir la existencia de atenuación estática y dinámica, lo que está indicado por la curvatura cóncava hacia el eje de ordenadas.

3.4. Medidas de tiempo de vida de luminiscencia

Se añadieron diferentes concentraciones de cobre a una disolución del complejo [Eu(Tc)(HP)] al objeto de detectar los cambios en el tiempo de vida de luminiscencia causados por la atenuación debida al cobre. Los tiempos de vida medios τ se determinaron

usando una cámara CCD capaz de obtener la imagen de las microplacas de 96 pocillos conteniendo las disoluciones con las distintas concentraciones de cobre. El montaje instrumental se hizo de acuerdo con el dispositivo propuesto por Liebsch et al. [27] con pequeñas modificaciones [19]. La obtención de imagen en tiempo resuelto obtenida de acuerdo con la técnica Determinación Rápida de Tiempos de vida (RLD) mediante el uso de un sistema de imagen es una buena opción para determinar tiempos de vida de luminiscencia. Para ello tenemos que integrar la fluorescencia durante dos ventanas de tiempo, la primera con un tiempo de retraso (t_d) de 0 μs y un tiempo de integración (t_g) de 50 μs , y la segunda con un tiempo de retraso de 50 μs y un tiempo de integración de 50 μs , aplicando un pulso de excitación de 60 μs .

Tras suprimir el ruido de fondo de las diferentes imágenes se aplica la siguiente expresión para calcular el tiempo de vida medio:

$$\tau = \frac{|t_1 - t_2|}{\ln \frac{A_1}{A_2}} \quad (7.7)$$

Donde t_1 es el tiempo de retraso de la primera ventana de medida, t_2 el tiempo de retraso de la segunda ventana de medida. A_1 es la señal integrada obtenida en la primera ventana de medida y A_2 la señal integrada obtenida en la segunda ventana de medida. La expresión anterior (ec. 7.7) solo ajusta decaimientos de tipo monoexponencial. Para decaimientos multiexponenciales, como es el caso del complejo [Eu(Tc)(HP)], solo permite estimar el valor de tiempo de vida medio de forma aproximada. Es importante indicar que en este caso los valores seleccionados para los tiempos t_d y t_g en cada una de las ventanas de medida influirán en el valor de tiempo de vida medio calculado utilizando este modelo [28].

De las imágenes obtenidas con la cámara (Fig. 7.3a), calculamos el tiempo de vida medio (τ) del complejo en presencia de diferentes concentraciones de cobre, observándose una disminución en el tiempo de vida a medida que aumenta la concentración de cobre (Fig. 7.3b).

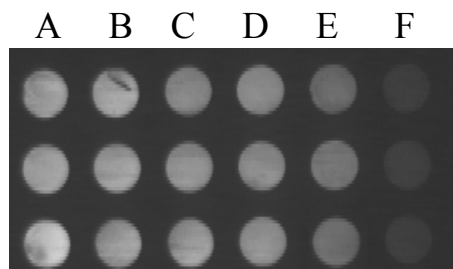


Figura 7.3a. Determinación Rápida de Tiempos de vida (RLD) del complejo $\text{Eu}(\text{Tc})(\text{HP})$ en presencia de diferentes concentraciones de cobre. A) 0; B) 0,2; C) 0,5; D) 0,75; E) 1 y F) $5 \mu\text{M}$ $\text{Cu}(\text{II})$.

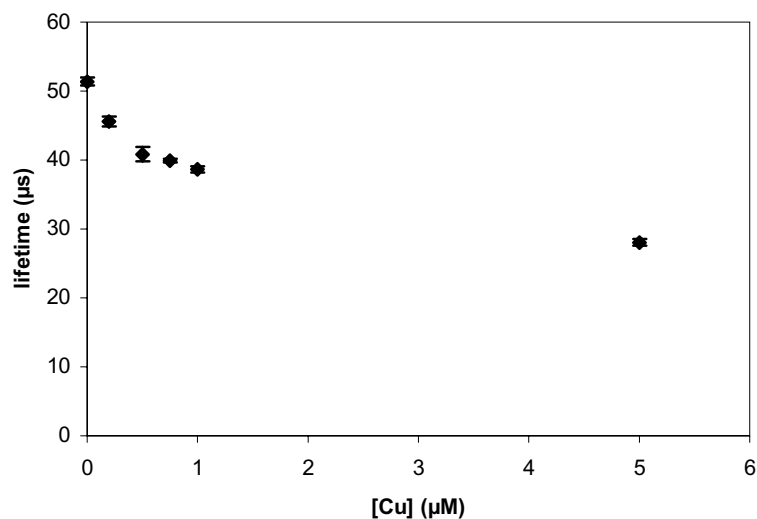


Figura 7.3b. Descenso del tiempo de vida medio con la concentración de cobre. Cuatro réplicas en cada caso.

La Figura 7.4 muestra la representación de Stern-Volmer, en la que representamos $(\tau_0/\tau)-1$ frente a la $[\text{Cu}(\text{II})]$, siendo τ_0 el tiempo de vida del complejo $[\text{Eu}(\text{Tc})(\text{HP})]$ en ausencia de cobre.

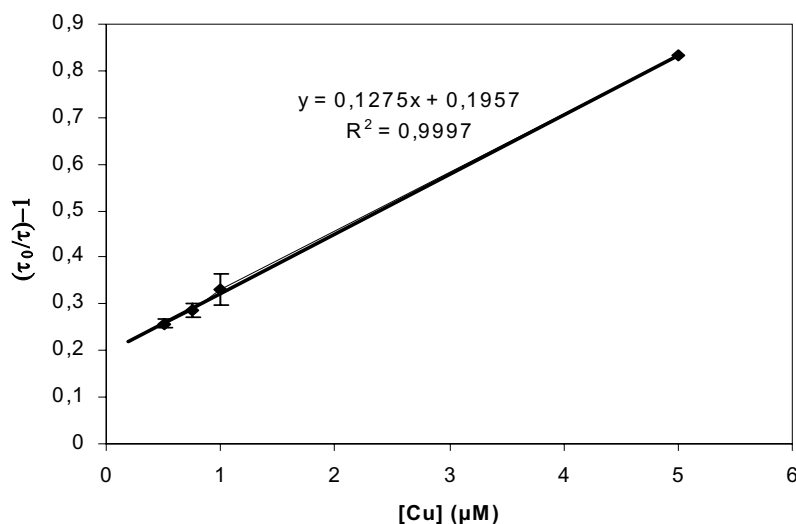


Figura 7.4. Representación de Stern-Volmer: $(\tau_0/\tau)-1$ vs. [Cu (II)]. Cuatro réplicas en cada caso.

La pendiente de esta función lineal nos da la constante de atenuación dinámica. Partiendo de los datos de intensidad de fluorescencia (Figura 7.2), podemos representar $[(F_0/F)-1]/[Cu (II)]$ frente a la $[Cu (II)]$ como se muestra en la Figura 7.5.

Consecuentemente, podemos calcular las constantes de atenuación dinámica y estática. La pendiente de esa representación es el producto $K_D \cdot K_S$ y la ordenada en el origen es la suma $K_D + K_S$, siendo K_D la constante de atenuación dinámica y K_S la constante de atenuación estática. En nuestro caso, $K_D \cdot K_S = 3 \cdot 10^{11}$ y $K_D + K_S = 2 \cdot 10^6$, resolviendo este sistema de ecuaciones obtenemos los valores de $1,63 \cdot 10^5$ y $1,84 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ para cada una de las constantes. La pendiente de la representación $(\tau_0/\tau)-1$ vs $[Cu (II)]$ (Fig. 7.4) es congruente con un valor de K_D de $1,28 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$, consecuentemente, asignamos para $K_S = 1,84 \cdot 10^6$ y para $K_D = 1,63 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$.

A partir de la constante de atenuación dinámica K_D y del tiempo de vida medio del complejo $[Eu(Tc)(HP)]$ en ausencia de Cu (II) (τ_0), podemos calcular la constante de atenuación bimolecular utilizando la expresión $K_D = K_q \cdot \tau_0$, por lo que $K_q = 2,5 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

Se utilizó la técnica de Determinación Rápida de Tiempos de vida (RLD) para estudiar la influencia de otras especies metálicas tales como, Fe (III), Ni (II), Zn (II), Ca (II) y Mg (II) sobre el tiempo de vida del complejo [Eu(Tc)(HP)]. Usando esta técnica no se observaron cambios claros en los tiempos de vida de [Eu(Tc)(HP)] para ninguna de las especies estudiadas excepto para Cu (II) (tabla 7.2).

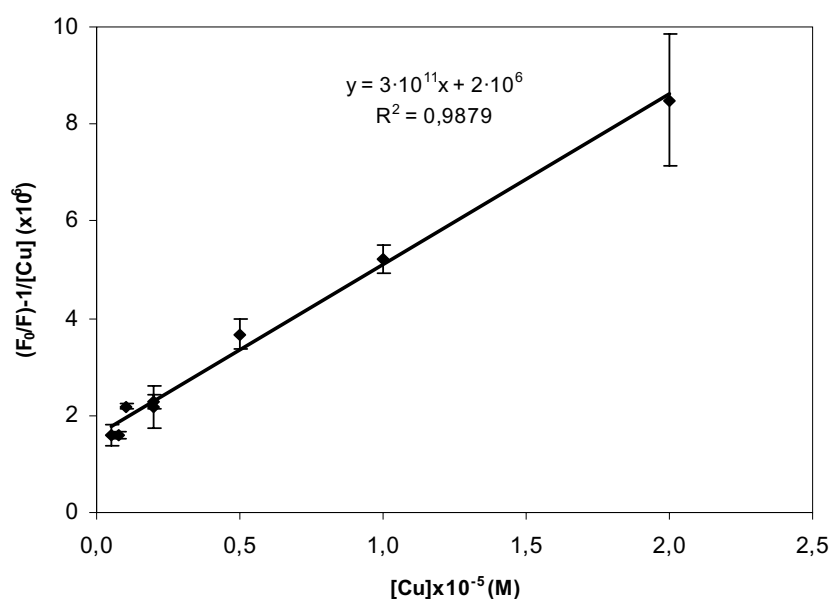


Figura 7.5. Representación para el cálculo de K_S y K_D . Cuatro réplicas en cada punto.

Para confirmar los valores de tiempos de vida medios obtenidos con el dispositivo de imagen RLD, se utilizó la técnica Time Correlated Single Photon Counting (TCSPC) para Cu (II) (Figura 7.6), Fe (III), Ni (II) y Zn (II). La tabla 7.1 muestra los tiempos de vida característicos de los diferentes términos incluidos en el modelo de decaimiento triexponencial global y el tiempo de vida medio del proceso de decaimiento total, así como las contribuciones relativas (%) consideradas como intensidades de fluorescencia relativas de las distintas componentes incluidas en el proceso global y expresadas en forma de porcentaje. En todos los casos los valores de χ^2 obtenidos son próximos a la unidad. Como es conocido

el valor de chi-cuadrado χ^2 indica la bondad del ajuste entre el modelo de decaimiento teórico y los puntos experimentales, debiendo ser próximo a la unidad para tener un buen ajuste. Los cálculos de tiempos de vida suponiendo un modelo de decaimiento biexponencial originan en todos los casos mayores valores de χ^2 con un ajuste menos preciso.

Comparando los resultados obtenidos para cobre utilizando ambas técnicas RLD y TCSPC muestran un razonable acuerdo, excepto para el caso del Fe (III) (tabla 7.2) lo que puede ser debido a que la técnica de imagen RLD no es suficientemente sensible como para detectar cambios tan pequeños en el tiempo de vida medio considerando su complicado modelo de decaimiento tri-exponencial. A la vista de los resultados obtenidos consideramos Fe (III) y Ni (II), al igual que Cu (II), como atenuadores dinámicos y estáticos, y el resto de los iones estudiados (Zn, Ca y Mg) como atenuadores puramente estáticos. La disminución en el tiempo de vida del complejo Eu(Tc)(HP) debida a Cu (II) es más acusada que en el caso de Fe (III) y Ni (II).

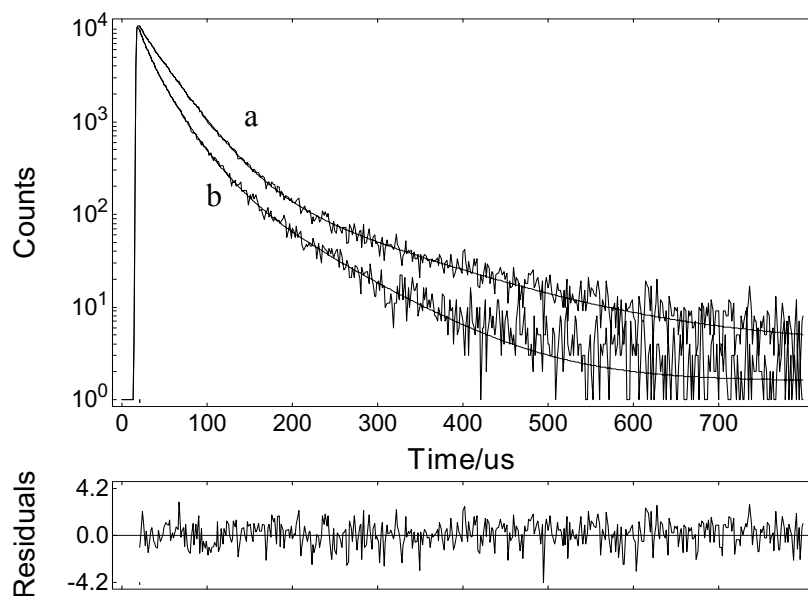


Figura 7.6. Espectros de decaimiento de tiempo de vida del complejo Eu(Tc)(HP): a) en ausencia y b) en presencia de Cu (II) (10 μ M).

Tabla 7.1. Tiempos de vida y contribuciones relativas (%) utilizando la técnica TCSPC y suponiendo un modelo de decaimiento tri-exponencial. Tiempo de vida medio (τ) y chi-cuadrado χ^2 .

Disolución	τ_1	τ_2	τ_3	(τ)	χ^2
EuTc+HP	5,6 μ s (1 %)	32,6 μ s (86 %)	134,3 μ s (13 %)	45,0 μ s	1,261
EuTc+HP+Cu (II)	10,1 μ s (16 %)	26,7 μ s (67 %)	81,7 μ s (17 %)	33,3 μ s	1,328
EuTc+HP+Fe (III)	4,6 μ s (1 %)	30,0 μ s (88 %)	112,3 μ s (11 %)	38,6 μ s	1,418
EuTc+HP+Ni (II)	5,0 μ s (2 %)	30,9 μ s (86 %)	107,1 μ s (12 %)	40,0 μ s	1,588
EuTc+HP+Zn (II)	5,1 μ s (2 %)	30,6 μ s (85 %)	114,1 μ s (13 %)	41,1 μ s	1,427

Para calcular las correspondientes constantes de atenuación dinámica y estática, se midió la intensidad de fluorescencia y el tiempo de vida del complejo [Eu(Tc)(HP)] en presencia de distintas concentraciones de los diferentes iones metálicos estudiados. En todos los casos, se representó $(F_0/F) - 1$ frente a la concentración de ión metálico, siendo F_0 la intensidad de fluorescencia de la disolución conteniendo al complejo de Eu (III) en ausencia de metal. De la pendiente de la representación se calculó la constante de atenuación estática para cada una de las especies. Para los atenuadores dinámicos, como es el caso del Fe (III), se representó $(\tau_0/\tau) - 1$ frente a la concentración de metal, siendo τ_0 el tiempo de vida del complejo [Eu(Tc)(HP)] en ausencia de metal. De la pendiente de estas representaciones se calcularon las constantes de atenuación dinámica. En todos los casos se cumplió que los valores de K_S y K_D son menores que para Cu (II) (Tabla 7.3). Para Zn (II), Ca (II) y Mg (II) no se observa disminución en el tiempo de vida del complejo ternario de Eu (III) a medida que aumentamos la concentración de dichas especies, por lo que los consideramos atenuadores puramente estáticos.

En otros sistemas estudiados que también emplean lantánidos como sondas luminiscentes, se han descrito atenuación dinámica y estática debida a cobre, tal es el caso de la atenuación de luminiscencia producida por Cu (II) sobre iones Eu (III) retenidos por intercambio iónico en membranas de carboximetil celulosa [24], o el de atenuación de luminiscencia del complejo terpiridina-poliaminopolicarboxilato de Eu (III) [25] también producida por Cu (II), atenuación que se debe en ambos casos a la naturaleza paramagnética de los iones Cu (II).

Tabla 7.2. Comparación del tiempo de vida medio calculado utilizando las técnicas RLD y TCSPC. [Eu(Tc)] = 40 μ M; [HP] = 0,4 mM; [Metal] = 10 μ M, excepto para [Ca (II)] = 2,4 mM y [Mg (II)] = 1,2 mM.

Disolución	RLD (τ)	TCSPC (τ)
EuTc + HP	48,2 μ s	45,0 μ s
EuTc + HP + Cu (II)	28,0 μ s	33,3 μ s
EuTc + HP + Fe (III)	44,3 μ s	38,6 μ s
EuTc + HP + Ni (II)	43,7 μ s	40,0 μ s
EuTc + HP + Zn (II)	46,0 μ s	41,1 μ s
EuTc + HP + Ca (II)	46,7 μ s	-
EuTc + HP + Mg (II)	46,3 μ s	-

Tabla 7.3. Constantes de atenuación dinámica (K_D) y estática (K_S) para Cu (II), Fe (III), Ni (II), Zn (II), Mg (II) y Ca (II).

Metal	K_S (M^{-1})	K_D (M^{-1})
Cu (II)	$1,8 \cdot 10^6$	$1,6 \cdot 10^5$
Fe (III)	$2,7 \cdot 10^4$	$2,7 \cdot 10^3$
Ni (II)	$5,4 \cdot 10^3$	$2,0 \cdot 10^3$
Zn (II)	$1,2 \cdot 10^3$	-
Mg (II)	$3,2 \cdot 10^2$	-
Ca (II)	$1,7 \cdot 10^2$	-

Otros iones metálicos también son capaces de originar atenuación dinámica de luminiscencia, pero en menor grado que cobre, especialmente los iones coloreados tales como Fe (III), Ni (II), Co (II) y Cr (III), debido al solapamiento de su banda de absorción con la banda de emisión del Eu (III). En el caso de iones incoloros tales como Pb (II), Zn (II), Cd (II) y Hg (II) no se observa atenuación dinámica [24,25]. Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con los resultados obtenidos por Kessler [25] y Arakawa y Akamine [24] antes señalados, aunque las constantes de atenuación dinámica calculadas por nosotros para Fe (III) y Ni (II) son mayores que las propuestas por ellos. Adicionalmente, nosotros encontramos que Ca (II) y Mg (II) se comportan como atenuadores estáticos además de Zn (II).

3.5. Ensayo para determinación de cobre mediante intensidad de fluorescencia en tiempo resuelto

La atenuación de luminiscencia de complejos de europio es un prometedor ensayo para la determinación de cobre en muestras de agua [24,25]. Mediante el uso de un lector de microplacas se puede lograr un análisis rápido para un gran número de muestras a la vez. Se prepararon dos series de patrones para establecer la función de calibrado, una serie en la zona de máxima pendiente formada por nueve patrones y cuatro réplicas de cada uno; entre 0,0025 y 1 μM ; y una segunda serie en la zona de máxima atenuación formada por cinco patrones y cuatro réplicas de cada uno, entre 2 y 40 μM (Figura 7.7). La linealidad de cada serie se comprobó aplicando un test de fallo de ajuste, obteniéndose para la zona de máxima pendiente la siguiente función lineal: $\text{FI} = -21872 [\text{Cu (II)}] + 36488$. El límite de detección se calculó aplicando la habitual expresión recomendada por la IUPAC [29]: $3 \cdot \text{SD}(\text{blanco})/\text{pendiente}$, obteniéndose un valor de 0,2 μM ($12 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) de Cu(II). El límite superior del rango dinámico lineal del ensayo se calculó a partir del punto de intersección de la función de calibrado ($\text{FI} = -21872 [\text{Cu (II)}] + 36488$) con la función establecida en la zona de máxima atenuación ($\text{FI} = -51,3 [\text{Cu (II)}] + 1862,4$). De acuerdo con esto, el rango dinámico lineal para la determinación de cobre va desde 0,2 a 1,6 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cu (II) (12 a $101 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). La tabla 7.4 resume los diferentes parámetros analíticos calculados, ordenada en origen, pendiente y nivel de probabilidad que fue calculado usando el software Statgraphics. El límite de detección obtenido con este método es comparable al obtenido en un trabajo previo basado en el uso de un complejo de europio terpiridilo [25], con la ventaja de la fácil preparación de nuestro complejo indicador [Eu(Tc)(HP)], que presenta una intensidad de fluorescencia suficiente y un rendimiento cuántico de $\Phi = 0,04$ [23].

3.6. Ensayo RLD para la determinación de cobre

El límite de detección y el rango dinámico fueron establecidos usando la técnica RLD. En este caso se prepararon cinco patrones y cuatro réplicas de cada uno de ellos para establecer la función de calibrado (Figura 7.3b), con concentraciones de cobre comprendidas entre 0,2 y 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cu (II). El límite de detección, calculado como en el apartado anterior,

también fue de $0,2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cu (II) ($12 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). Pero en este caso el rango dinámico lineal fue más corto, desde $0,2$ a $0,9 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cu (II) (12 a $57 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), (Tabla 7.4).

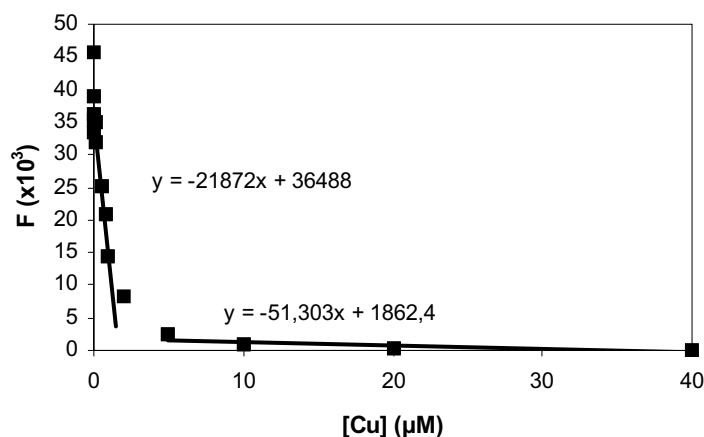


Figura 7.7. Función de calibrado para Cu (II). Intensidad de fluorescencia frente a la concentración de cobre.

Tabla 7.4. Parámetros analíticos

Parámetro	Fluorescencia en tiempo resuelto Valor; S	RLD Valor; S
Ordenada en el origen	36488; 393,6	46,4; 1,4
Pendiente	-21872; 864,6	$-8,3 \cdot 10^6$; $2,1 \cdot 10^6$
Test de fallo de ajuste (%)	12,3	5,7
Rango dinámico lineal ($\mu\text{g}/\text{L}$)	12 - 101	12 - 57
Límite de detección ($\mu\text{g}/\text{L}$)	12	12

3.7. Interferencias de otras especies metálicas

Con el fin de examinar los efectos producidos por otros iones metálicos en la intensidad de fluorescencia del complejo $[\text{Eu}(\text{Tc})(\text{HP})]$ se probaron una serie de iones tales como, Al (III), Co (II), Ni (II), Zn (II), Mg (II), Ca (II), Ag (I), Mn (II) y Fe (III), y se comparó la atenuación de intensidad producida por ellos con la producida por Cu (II). En

todos los casos se prepararon disoluciones que contenían $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Eu(Tc), $0,4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ HP y $0,13 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ del correspondiente ión metálico, excepto en el caso de Mg (II) ($25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y Ca (II) ($100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), que son concentraciones usuales de estos iones en muestras de agua. Todas las disoluciones se prepararon en tampón MOPS 10 mM de pH 6,9. Las intensidades de fluorescencia resultantes fueron medidas en el lector de microplacas en tiempo resuelto seleccionando un tiempo de retraso de $60 \mu\text{s}$ y un tiempo de integración de $40 \mu\text{s}$.

En la Figura 7.8 se resumen los resultados obtenidos, observándose que el descenso de intensidad de fluorescencia debido a Cu (II) es mayor que para el resto de las especies estudiadas. Al (III), Ag (I) y Mn (II) no originan gran interferencia (por debajo del 10%) pero iones habituales como Mg (II), Ca (II) y Fe (III) interfieren fuertemente.

En trabajos previos se ha estudiado la interferencia debida a especies aniónicas, encontrándose que citrato y fosfato también pueden disminuir la intensidad de fluorescencia y el tiempo de vida de los complejos de europio [30,31].

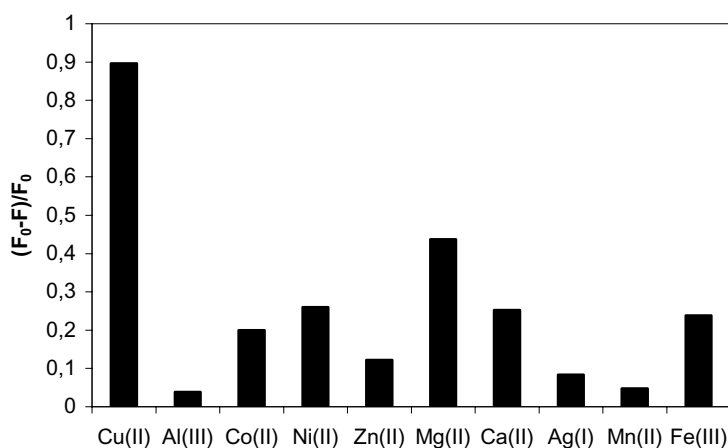


Figura 7.8. Comparación de la atenuación de fluorescencia producida por distintos iones metálicos con respecto a Cu (II).

3.8. Validación del ensayo para cobre en muestras de agua

Con el objetivo de comprobar la utilidad y validez del procedimiento propuesto se aplicó el método basado en la medida de intensidad de fluorescencia en tiempo resuelto a muestras de agua de diversa procedencia (agua de río, agua de grifo de casas con tuberías antiguas de cobre y agua industrial). Teniendo en cuenta la acción de los posibles interferentes presentes en las muestras de agua se optó por utilizar el método de adición de patrón. Se prepararon los distintos patrones adicionándoles un volumen de muestra comprendido entre 25 y 800 μL , concentraciones de cobre comprendidas entre 0,2 y 1,5 μM , 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Eu(Tc) y 0,4 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ HP, todo ello enrasado con tampón 10 mM MOPS de pH 6,9 hasta 10 mL.

En la Tabla 7.5 observamos los resultados obtenidos por el procedimiento propuesto y por el de referencia, que fue un método fotométrico de Merck basado en la complejación de cobre utilizando dietilditiocarbamato sódico como agente complejante. Los valores mostrados en dicha tabla corresponden a la media de tres réplicas de cada muestra para cada uno de los métodos. También está incluida la desviación estándar de estas réplicas y el valor P del test de comparación de medias, que nos indica que en ningún caso existe diferencia significativa entre los resultados obtenidos con nuestro método y los resultados obtenidos mediante el método de referencia, pues siempre el valor $P_{\text{value}} > 5\%$.

Como resultado de este estudio, el ensayo fluorescente para cobre solamente es seguro para muestras de agua residual contaminadas con concentraciones elevadas de cobre. El valor máximo permitido en Europa para cobre en aguas de consumo humano es de 2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, por lo tanto el límite de detección del método propuesto es inferior a este límite legal. La ventaja que presenta es la simplicidad y la rapidez con la que se pueden realizar los análisis. Solamente se requieren pequeños volúmenes de muestra y un elevado número de muestras puede analizarse simultáneamente mediante un screening basado en micropocillos.

Se seleccionó el método de medida de intensidad de fluorescencia en tiempo resuelto en vez del método RLD para llevar a cabo las aplicaciones, porque el rango dinámico lineal era más amplio en este caso, aunque el método RLD presentaba menos interferentes. De

todas formas el problema de los interferentes se superó utilizando el método de adición de patrón.

Tabla 7.5. Determinación de cobre en diferentes muestras de agua utilizando un método fotométrico de Merck como referencia.

Muestra	Método de atenuación ($\mu\text{M Cu}$)	S	Método de referencia (μMCu)	S	P _{val} (%)
Agua de grifo	2,2	0,9	1,36	0,02	17,1
Agua de origen industrial	21,2	6,5	21,3	2,0	98,6
Agua de río (<i>Danubio</i>)	0,6	0,4	0,24	0,02	20,7

4. Conclusiones

Los iones Cu (II) producen atenuación estática y dinámica en la fluorescencia del complejo europio (III)-tetraciclina-peróxido de hidrógeno. Se han calculado las constantes de atenuación utilizando la adecuada técnica de imagen de Determinación Rápida de Tiempos de vida (RLD). Los resultados obtenidos fueron corroborados con la técnica de Time Correlated Single Photon Counting (TCSPC). Las interferencias debidas a otras especies metálicas como Fe (III), Zn (II), Ni (II), Ca (II) and Mg (II) también han sido estudiadas. Basado en estos resultados, se ha desarrollado un método para la determinación de cobre basado en la atenuación de fluorescencia del complejo [Eu(Tc)(HP)] en disolución acuosa. El método de medida de intensidad de fluorescencia en tiempo resuelto se utilizó para la determinación de cobre en diferentes muestras reales de agua. En combinación con el método de adición de patrón se pueden determinar concentraciones altas de cobre en aguas residuales.

Agradecimientos

Agradecemos la financiación al Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (Referencia de beca: AP2000-0732).

Bibliografía

- [1] F. S. Richardson, *Chem. Rev.* 82, 541-552 (1982).
- [2] R. W. Horobin, *J. Microscopy* 119, 345-355 (1980).
- [3] S. Osman, U. Turpeinen, O. Itkonen, and U.-H. Stenman, *J. Immun. Meth.* 161, 97-106 (1993).
- [4] E. Markela, T. H. Stahlberg, y I. Hemmilä, *J. Immun. Meth.* 161, 1-6 (1993).
- [5] P. A. Maple, C. S. Jones, y N. J. Andrews, *J. Clin. Pathol.* 54, 812-815 (2001).
- [6] N. Weibel, L. J. Charbonniere, M. Guardigli, A. Roda, y R. Ziessel, *J. Am. Chem. Soc.* 126, 4888-4896 (2004).
- [7] I. Hemmilä y V.-M. Mikkola, *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 38, 441-519 (2001)
- [8] B. Geoff, *Immunodiagnosics*, 137-158 (1999).
- [9] P. R. Selvin, *Top. Fluorescence Spectr.* 7, 177-212 (2003).
- [10] P.R. Selvin, *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Structure* 31, 275-302 (2002).
- [11] J. Chen, and P. R. Selvin, *J. Am. Chem. Soc.* 122, 657-660 (2000).
- [12] F. J. Steemers, W. Verboom, D. N. Reinhoudt, E. B. van der Tol, y J. W. Verhoeven, *J. Am. Chem. Soc.* 117, 9408-9414 (1995).
- [13] C. Yang, L. M. Fu, Y. Wang, J.-P. Zhang, W.-T. Wong, X.-C. Ai, Y.-F. Quiao, B.-S. Zou, y L.-L. Gui, *Angew. Chem. Int. Ed.* 43, 5010-5013 (2004).
- [14] L. M. Hirschy, T. F. van Geel, J. D. Winefordner, R. N. Kelly, y S. G. Schulman, *Anal. Chim. Acta* 166, 207-219 (1984).
- [15] O. S. Wolfbeis, A. Dürkop, M. Wu, y Z. Lin, *Angew. Chem. Int. Ed.* 41, 4495-4498 (2002).

- [16] S. I. Klink, H. Keizer, y F. C. J. M. van Veggel, *Angew. Chem. Int. Ed.* 39, 4319-4321 (2000).
- [17] B. Alpha, J. M. Lehn, y G. Mathis, *Angew. Chem. Int. Ed.* 26, 266-267 (1987).
- [18] M. Xiao, y P. Selvin, *J. Am. Chem. Soc.*, 123, 7067-7073 (2001).
- [19] M. Schäferling, M. Wu, J. Enderlein, H. Bauer, y O. S. Wolfbeis, *Appl. Spectroscopy* 57, 1386-1392 (2003).
- [20] M. Schäferling, M. Wu, y O. S. Wolfbeis, *J. Fluorescence* 14, 561-568 (2004).
- [21] M. Wu, Z. Lin, M. Schäferling, A. Dürkop, y O. S. Wolfbeis, *Anal. Biochem.* (2005), in print.
- [22] Z. Lin, M. Wu, M. Schäferling, y O.S. Wolfbeis, submitted.
- [23] M. Wu, Z. Lin, y O. S. Wolfbeis, *Anal. Biochem.* 320, 129-135 (2003).
- [24] T. Arakawa, y M. Akamine, *Sens. Actuators B* 91, 252-255 (2003).
- [25] M. A. Kessler, *Anal. Chim. Acta* 364, 125-129 (1998).
- [26] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy* (2nd Ed.), Kluwer Academic/Plenum New York (1999).
- [27] G. Liebsch, I. Klimant, B. Frank, G. Holst, y O. S. Wolfbeis, *Appl. Spectroscopy* 54, 548-559 (2000).
- [28] K. K. Sharman, A. Periasamy, H. Ashworth, J. N. Demas, N.H. Snow, *Anal. Chem.* 71, 947-952 (1999).
- [29] IUPAC, *Spectrochimica Acta B*, 33 B, 242 (1978).
- [30] Z. Lin, M. Wu, M. Schäferling, O. S. Wolfbeis, *Angew. Chem. Int. Ed.* 43, 1735-1738 (2004).
- [31] O. S. Wolfbeis, M. Schäferling, A. Dürkop, *Microchim. Acta* 143, 221-227 (2003).

ANEXO I

SÍNTESIS DEL CROMOIONÓFORO 9-DIMETILAMINO-5-[4-(15-BUTIL-1,13-DIOXO-2,14-DIOXANONADecil)FENILIMINO]BENZO[A]FENOXAZINA (ETH 5418)

La síntesis del cromoionóforo 9-dimetilamino-5-[4-(15-butil-1,13-dioxo-2,14-dioxanonadecil)fenilimino]benzo[a]fenoxazina, conocido como ETH 5418, fue llevada a cabo de acuerdo con el procedimiento descrito en el año 1993 por Bakker *et al.*[1] para sintetizar el ETH 2439, pero utilizando ácido 4-aminobenzoico en vez de ácido 4-aminofenilacético. Este procedimiento consta de cinco etapas, pero nosotros le añadimos dos etapas más de protección y desprotección del grupo amino del ácido 4-aminobenzoico para tratar de mejorar el rendimiento del proceso.

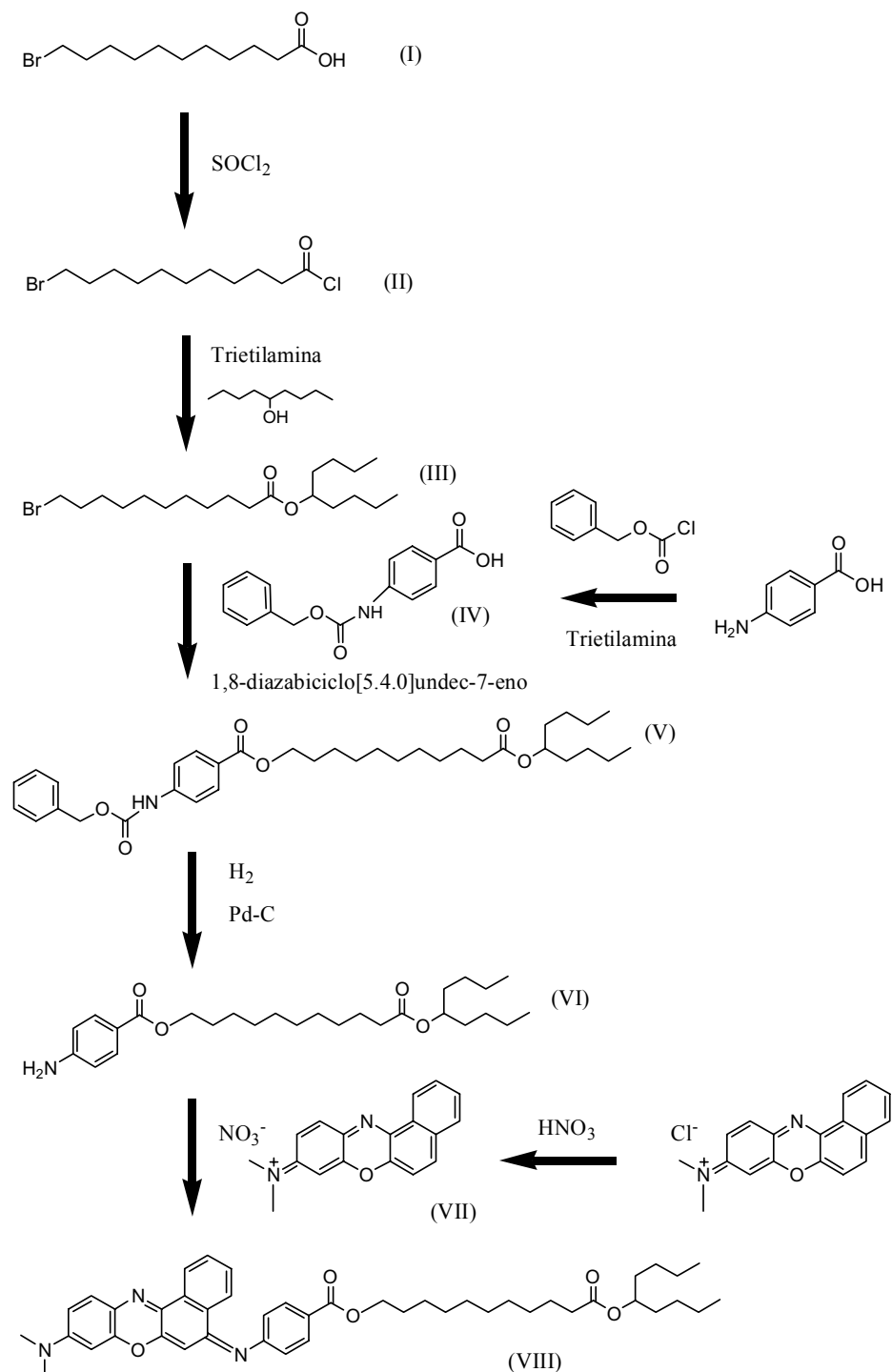


Figura A.1. Esquema de las reacciones seguidas para la síntesis del cromoforo ETH 5418.

Síntesis del cloruro del ácido 11-bromoundecanoico (II): A una disolución del ácido 11-bromoundecanoico (I) (10 g; 38 mmol) en tolueno destilado (160 ml) se añade gota a gota una disolución de cloruro de tionilo (20 ml, 276 mmol) en tolueno (40 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas y posteriormente durante 2 horas a 80° C. A continuación, se evapora el tolueno en un rotavapor quedándonos el cloruro del ácido como un líquido marrón, éste se hace reaccionar rápidamente con 5-nonanol en la siguiente etapa para evitar que se hidrolice ya que los cloruros de ácido se hidrolizan fácilmente con la humedad del ambiente.

Síntesis del 11-bromo-(1-butilpentil)undecanoato (III): El cloruro del ácido 11-bromoundecanoico obtenido en la etapa anterior se disuelve en 50 ml de diclorometano y a esta disolución se le añade gota a gota otra disolución de 5-nonanol (6,7 ml, 38 mmoles) y trietilamina (6,0 ml, 38 mmol) en diclorometano. Utilizamos diclorometano como medio de reacción y no dietil éter como decía el procedimiento descrito por Bakker et al. porque el dietil éter viene estabilizado con etanol y éste podría competir con el 5-nonanol en su reacción con el cloruro de ácido. La mezcla de reacción se agitó durante 4 horas a 0-5° C y durante 20 horas a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 100 ml más de diclorometano y se puso la fase orgánica con la reacción en su seno en un embudo de decantación, donde fue lavada en primer lugar con 50 ml de agua destilada para eliminar el clorhidrato de trietilamina formado durante la reacción, posteriormente con 50 ml de ácido clorhídrico al 5 % para neutralizar el exceso de trietilamina libre y finalmente con una disolución saturada de bicarbonato sódico para neutralizar el exceso de ácido clorhídrico al 5 %. A la fase orgánica obtenida después de los sucesivos lavados se le añade sulfato sódico anhidro y se filtra. Posteriormente se elimina el diclorometano en un rotavapor y se purifica el sólido obtenido mediante una columna cromatográfica con hexano/acetato de etilo (9:1) como eluyente. Se obtuvo 4,4 g (30%) del ester buscado. La estructura de este compuesto se estableció en base a sus datos espectroscópicos (¹H-RMN y ¹³C-RMN).

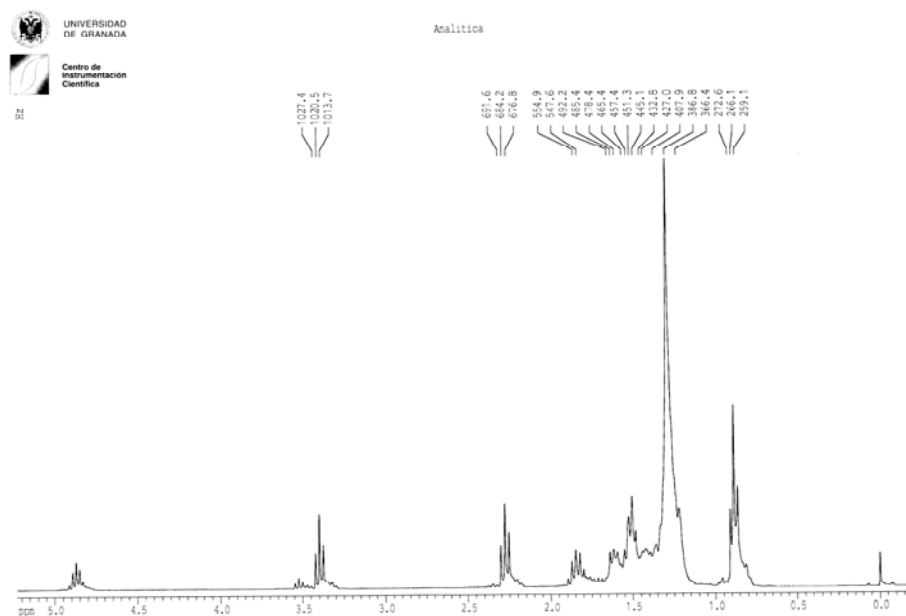


Figura A.2. Espectro $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) de 11-bromo-(1-butilpentil)undecanoato (III).

El espectro de $^1\text{H-RMN}$ (Figura A.2) es concordante con la estructura asignada, a δ 4,85 ppm aparece un quintuplete que corresponde al hidrógeno del carbono adyacente al oxígeno del grupo ester ($\text{CH}_2\text{-COO-CH}$), a δ 3,40 ppm aparece un triplete que corresponde a los hidrógenos del metileno contiguo al bromo ($\text{Br-CH}_2\text{-CH}_2$), a δ 2,25 ppm aparece un triplete que corresponde a los hidrógenos del metileno adyacente al carbono del grupo ester ($\text{CH}_2\text{-COO-CH}$), los multipletes que aparecen entre 1,90 y 1,15 ppm corresponden a los hidrógenos de los demás grupos metilénicos presentes en la molécula y por último, los hidrógenos de los dos grupos metilo aparecen como un triplete a 0,90 ppm.

El espectro del ^{13}C -RMN (Figura A.3) presenta como señales significativas la que aparece a δ 173,7 ppm correspondiente al carbono del grupo ester, la que aparece a 74,1 ppm correspondiente al carbono adyacente al oxígeno del grupo ester y la que aparece a 14,1 ppm correspondiente a los carbonos de los grupos metilo, el resto de señales entre 34,8 y 22,7 ppm corresponden a los carbonos metilénicos presentes en la molécula.

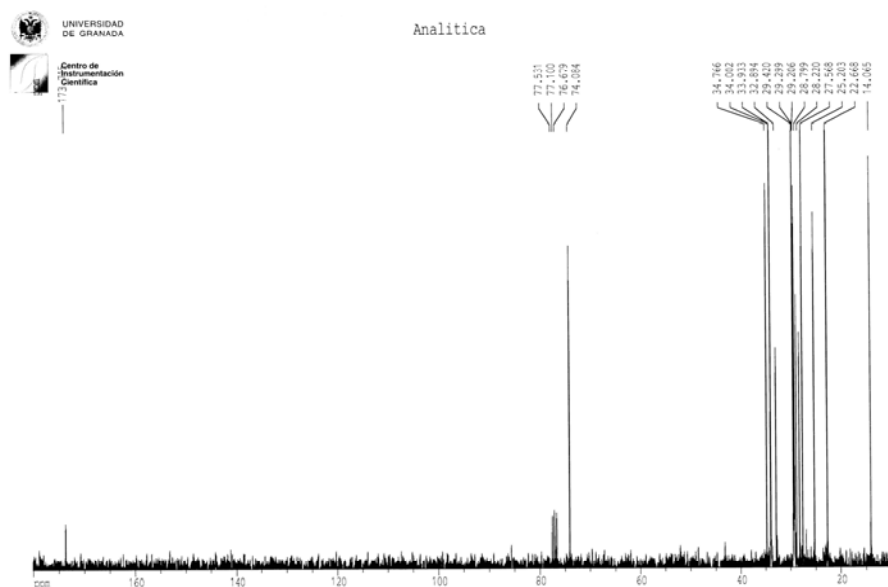


Figura A.3. Espectro ^{13}C -NMR (CDCl_3 , 100 MHz) de 11-bromo-(1-butylpentil)undecanoato (III).

Protección del grupo amino del ácido 4-aminobenzoico (IV): Esta etapa de protección del grupo amino del ácido 4-aminobenzoico se lleva a cabo para evitar que dicho grupo amino compita con el grupo ácido en la reacción que tiene lugar entre el ácido 4-aminobenzoico y el 11-bromo-(1-butylpentil)undecanoato. Para llevar a cabo esta etapa a una disolución de ácido 4-aminobenzoico (5,5 g; 40 mmol) y trietilamina (6,1 ml; 44 mmol) en

50 ml de tetrahidrofurano se le añade gota a gota una disolución de cloroformiato de bencilo (6,2 ml; 44 mmol) también en 50 ml de tetrahidrofurano. La mezcla de reacción se agita durante 4 horas a 0-5° C y durante 10 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se elimina el tetrahidrofurano en un rotavapor y la mezcla que queda se disuelve en 150 ml de diclorometano, a continuación es lavada con 100 ml de ácido clorhídrico al 10 % para eliminar los posibles restos de trietilamina, posteriormente se le añade sulfato sódico anhidro para eliminar el posible agua y por último se evapora el diclorometano en un rotavapor. El sólido obtenido se recrystaliza en una mezcla hexano/éter dietílico (1:1), obteniéndose 1,2 g (12 %) del derivado protegido del ácido 4-aminobenzoico. La estructura de este compuesto se estableció en base a datos espectroscópicos de IR y $^1\text{H-RMN}$.

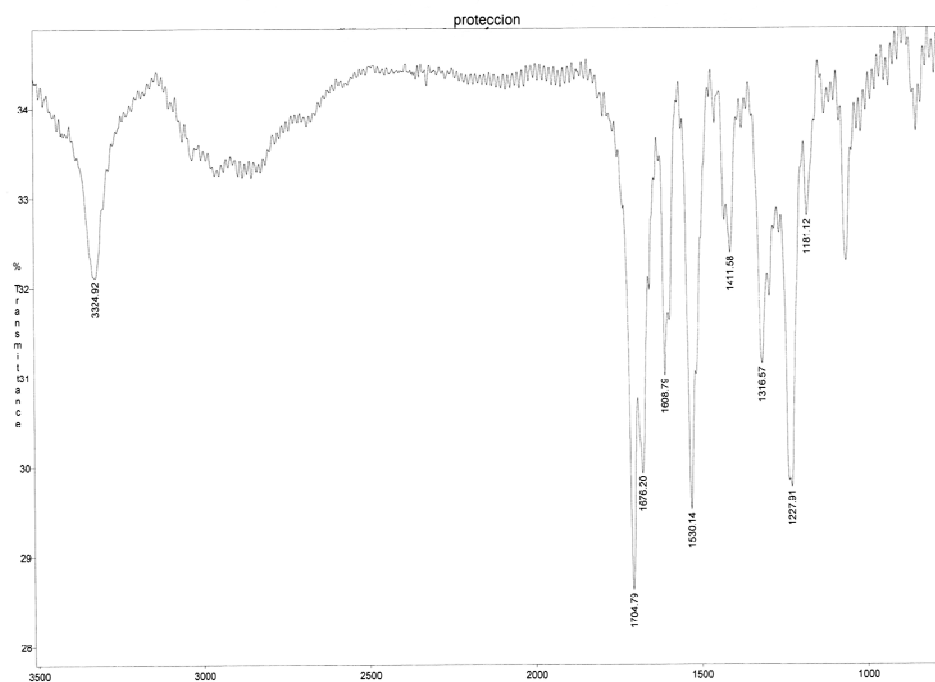


Figura A.4. Espectro IR (KBr) de IV.

Así el espectro IR (Figura A.4) presenta las bandas características de los grupos funcionales presentes en la molécula a 3325 cm^{-1} (NH), $3000\text{-}2600\text{ cm}^{-1}$ (banda ancha del OH del COOH), 1705 cm^{-1} (COO), 1676 cm^{-1} y 1530 cm^{-1} (CON).

En el espectro de ^1H -RMN (Figura A.5) se puede observar el hidrógeno del grupo ácido como singulete ancho a $12,50\text{ ppm}$, el hidrógeno del grupo amino como singulete a $10,15\text{ ppm}$, los hidrógenos de los anillos bencénicos resuenan como multiplete entre $7\text{ y }8\text{ ppm}$, y los hidrógenos del grupo metileno (CH_2) resuenan como singulete a $\delta\ 5,15\text{ ppm}$. La señal a $2,50\text{ ppm}$ corresponde al disolvente (DMSO).

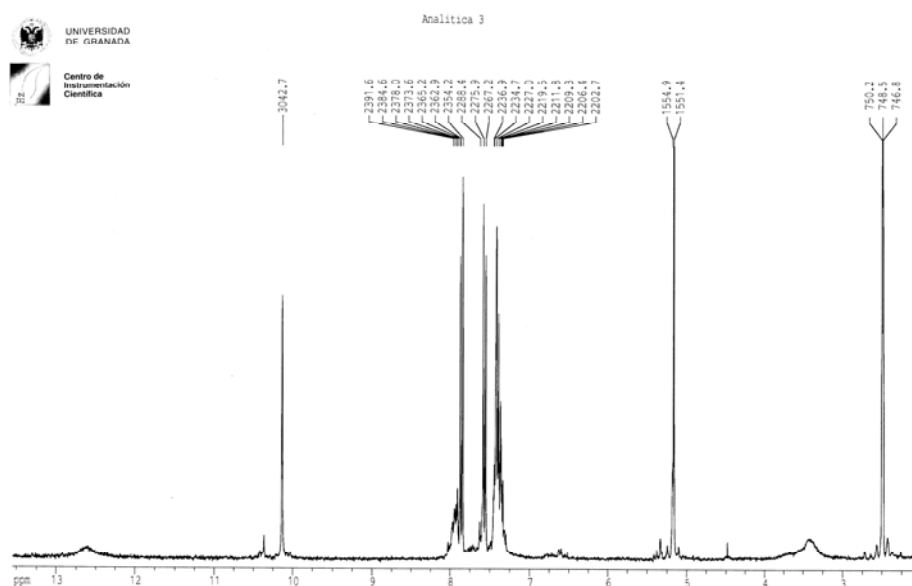


Figura A.5. Espectro ^1H -NMR (DMSO- Cl_3 , 400 MHz) de IV.

Síntesis del 11-[(1-butilpentil)oxi]-11-oxoundecil-4-aminobenzoato protegido con formiato de bencilo en el grupo amino (V): Se prepara una disolución del derivado protegido del ácido 4-aminobenzoico (IV) (1,2 g; 5 mmol), 11-bromo-(1-butilpentil)undecanoato (1,8 g; 5 mmol) y 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec -7-eno (0,7g; 5 mmol) en 80 ml de tolueno. La mezcla de reacción se pone a reflujo durante 20 horas y posteriormente se lava dos veces con agua destilada y se seca con sulfato sódico anhidro. El crudo obtenido se purifica mediante una columna cromatográfica de silica gel con hexano/acetato de etilo (10:3) como eluyente, obteniéndose 0,9 g (33%) de producto. La estructura de este compuesto se estableció en base a sus datos espectroscópicos (^1H -RMN y ^{13}C -RMN).

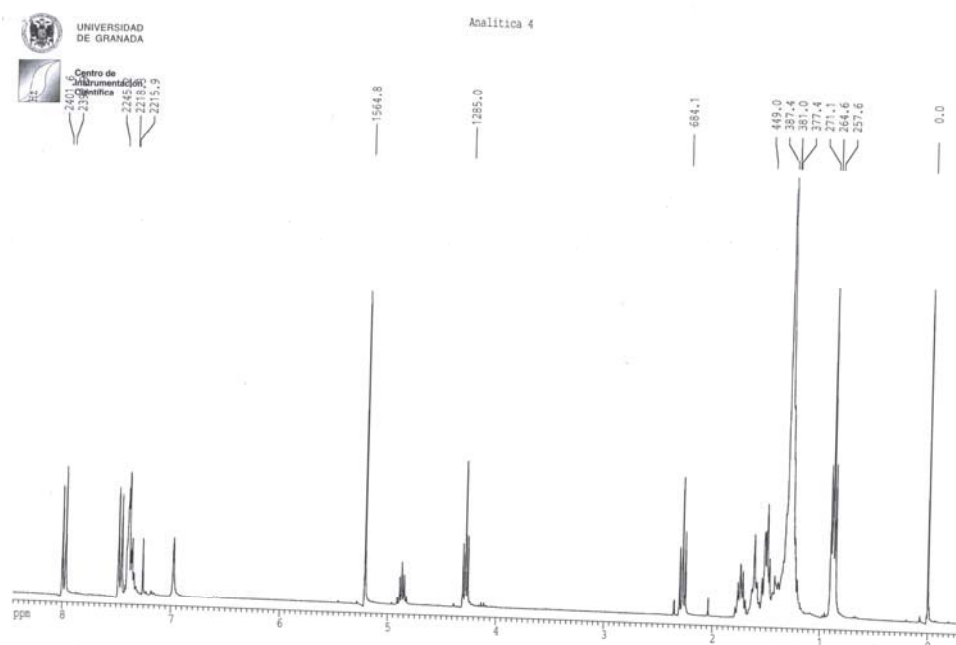


Figura A.6. Espectro ^1H -NMR (CDCl_3 , 400 MHz) de (V).

El espectro de ^1H -RMN (Figura A.6) es concordante con la estructura asignada, a δ 8 ppm aparece un duplete correspondiente a los dos hidrógenos del anillo bencénico disustituido más cercanos al grupo ester, a δ 7,50 ppm aparece otro duplete correspondiente a los otros dos hidrógenos del mismo anillo bencénico disustituido más cercanos al grupo amida, a δ 7,35 ppm aparece un multiplete correspondiente a los hidrógenos del otro anillo bencénico monosustituido, a δ 7,25 ppm aparece un singulete debido al disolvente (CDCl_3), a δ 7 ppm aparece un singulete correspondiente al hidrógeno del grupo amida, el singulete que resuena a δ 5,20 ppm corresponde a los hidrógenos del CH_2 contiguo al anillo bencénico monosustituido ($\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2\text{-COO}$), a δ 4,85 ppm aparece un quintuplete que corresponde al hidrógeno del carbono adyacente al oxígeno del grupo ester ($\text{CH}_2\text{-COO-CH}$), a δ 4,30 ppm aparece un triplete que corresponde a los hidrógenos del metileno contiguo al oxígeno del grupo ester unido al anillo bencénico disustituido ($\text{C}_6\text{H}_5\text{-COO-CH}_2$), a δ 2,25 ppm aparece un triplete que corresponde a los hidrógenos del metileno adyacente al carbono del otro grupo ester ($\text{CH}_2\text{-COO-CH}$), los multipletes que aparecen entre 1,90 y 1,15 ppm corresponden a los hidrógenos de los demás grupos metilénicos presentes en la molécula y por último, los hidrógenos de los dos grupos metilo aparecen como un triplete a 0,90 ppm.

El espectro del ^{13}C -RMN (Figura A.7) presenta como señales significativas la que aparece a δ 166,3 ppm correspondiente a los carbonos de los grupos ester, las señales que aparecen entre δ 117,7 y 131,0 ppm corresponden a los carbonos de los anillos aromáticos, el CH-O aparece a δ 74,2 ppm, los dos $\text{CH}_2\text{-O}$ aparecen a δ 67,4 y 65,1 ppm, el resto de señales entre δ 34,8 y 22,7 ppm corresponden a los demás carbonos metilénicos presentes en la molécula y la señal que aparece a δ 14,1 ppm corresponde a los carbonos de los grupos metilo.

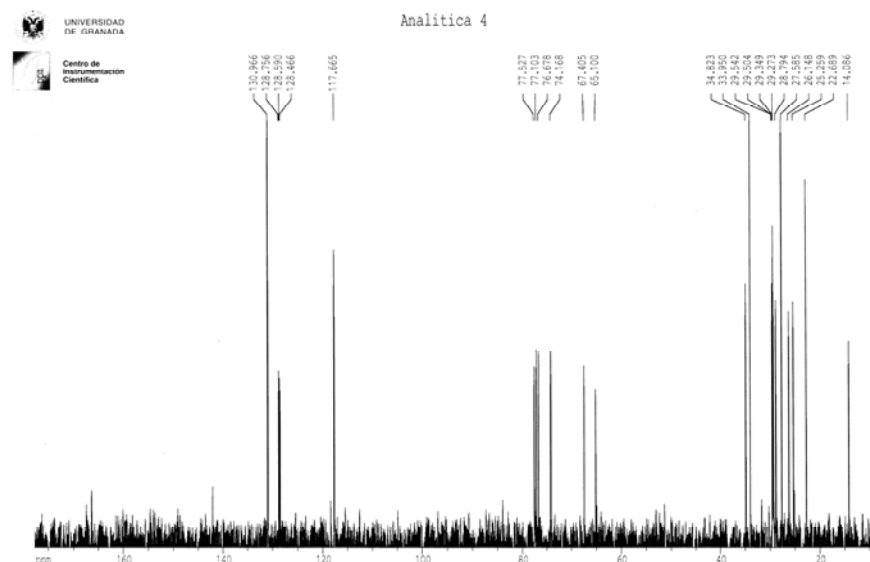


Figura A.7. Espectro ^{13}C -NMR (CDCl_3 , 100 MHz) de (V).

Hidrogenación catalítica del 11-[(1-butilpentil)oxi]-11-oxoundecil-4-aminobenzoato protegido con formiato de bencilo en el grupo amino (V): Esta hidrogenación catalítica se lleva a cabo para eliminar el formiato de bencilo como grupo protector del grupo amino. En ella a una disolución de 0,9 g (1,5 mmol) de (V) en 50 ml de metanol se le añade como catalizador paladio sobre carbón al 10 %. Se trata con H_2 a 2 atmósferas de presión durante 12 h a temperatura ambiente y bajo agitación magnética. La mezcla de reacción se filtra sobre ceolita y se lava con metanol. Los filtrados metanólicos se concentran a vacío, obteniéndose 0,6 g (86%) de 11-[(1-butilpentil)oxi]-11-oxoundecil-4-aminobenzoato (VI). Como en los casos anteriores la estructura de este compuesto fue establecida en base a sus datos espectroscópicos (^1H -RMN y ^{13}C -RMN).

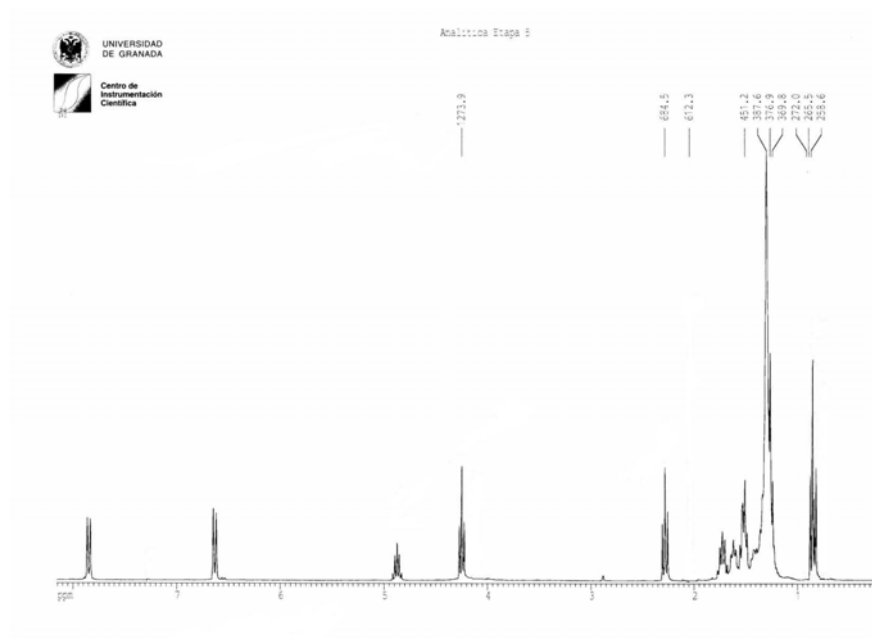


Figura A.8. Espectro $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) de 11-[(1-butilpentil)oxi]-11-oxoundecil-4-aminobenzoato (VI).

En el espectro de $^1\text{H-RMN}$ (Figura A.8) a δ 7,85 ppm aparece un duplete correspondiente a los dos hidrógenos del anillo bencénico más cercanos al grupo ester, el duplete que aparece a δ 6,60 ppm corresponde los otros dos hidrógenos del anillo bencénico más próximos al grupo amino, por debajo de δ 5 ppm aparecen las señales ya comentadas en el espectro $^1\text{H-RMN}$ de (V): a δ 4,85 ppm aparece un quintuplete que corresponde al hidrógeno del carbono adyacente al oxígeno del grupo ester ($\text{CH}_2\text{-COO-CH}$), a δ 4,30 ppm aparece un triplete que corresponde a los hidrógenos del metileno contiguo al oxígeno del grupo ester unido al anillo bencénico ($\text{C}_6\text{H}_5\text{-COO-CH}_2$), a δ 2,25 ppm aparece un triplete que corresponde a los hidrógenos del metileno adyacente al carbono del otro grupo ester ($\text{CH}_2\text{-COO-CH}$), los multipletes que aparecen entre δ 1,90 y 1,15 ppm corresponden a los hidrógenos de los demás grupos metilénicos presentes en la molécula y por último, los hidrógenos de los dos grupos metilo resuenan como un triplete a δ 0,90 ppm.

El espectro del ^{13}C -RMN (Figura A.9) presenta como señales significativas la que aparece a δ 173,7 ppm correspondiente a los carbonos de los grupos ester, la que aparece a δ 131,6 ppm correspondiente a los dos CH del anillo bencénico más próximos al grupo ester, a δ 113,8 ppm aparece la señal correspondiente los dos CH del anillo bencénico más próximos al grupo amino, por debajo de 80 ppm aparecen las señales ya comentadas en el espectro de ^{13}C -RMN de la especie (V): el CH-O aparece a δ 74,1 ppm, el $\text{CH}_2\text{-O}$ aparece a δ 64,5 ppm, el resto de señales entre δ 34,8 y 22,7 ppm corresponden a los demás carbonos metilénicos presentes en la molécula y la señal que aparece a δ 14,1 ppm corresponde a los carbonos de los grupos metilo.

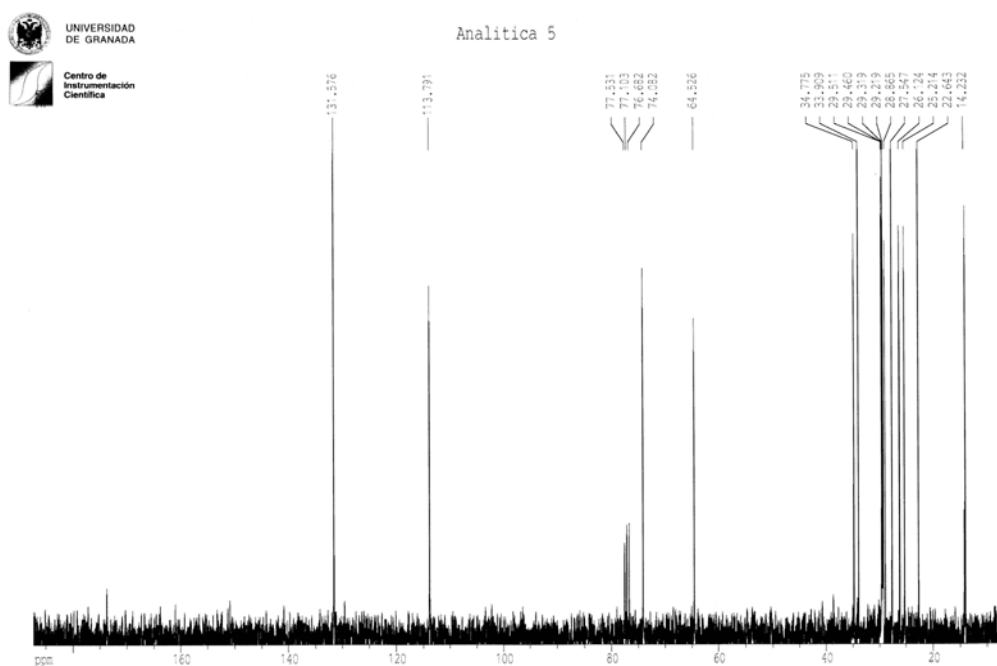


Figura A.9. Espectro ^{13}C -NMR (CDCl_3 , 100 MHz) de 11-[(1-butilpentil)oxi]-11-oxoundecil-4-aminobenzoato (VI).

Síntesis del nitrato de 8-(dimetilamino)-5H-benzo[a]fenoxazonio (VII): Se prepara una disolución de 8-dimetilamino-2,3-benzofenoxazina (0,6 g; 1,6 mmol) en 40 ml de agua destilada a 50-60° C. Posteriormente se filtra y se le añaden 1,5 ml de ácido nítrico al 65 %. Se deja durante 12 horas a 5° C y a continuación se filtra el precipitado resultante y se disuelve en 15 ml de etanol, se le añaden 150 ml de hexano y vuelve a filtrarse. Por último se lava con 50 ml de hexano y se seca a vacío. Se obtienen 0,2 g (43%) de producto.

Síntesis del ETH 5418 (VIII): Se prepara una disolución de nitrato de 8-(dimetilamino)-5H-benzo[a]fenoxazonio (VII) (168 mg; 0,5 mmol) y de 11-[(1-butilpentil)oxi]-11-oxoundecil-4-aminobenzoato (VI) (230 mg; 0,5 mmol) en 10 ml de etanol y se agita durante 12 horas en un matraz abierto. Posteriormente se disuelve el crudo obtenido en 60 ml de diclorometano y se lava con 80 ml de NaOH 0,1 M. A continuación se filtra la fase orgánica y se evapora el diclorometano, purificando el producto obtenido mediante cromatografía en columna de sílica gel empleando hexano/acetato de etilo (8:2) como eluyente. Se obtienen 75 mg (21%) de cromófono. Al igual que en casos anteriores su estructura se establece en base a sus datos espectroscópicos (masas, ^1H -RMN y ^{13}C -RMN).

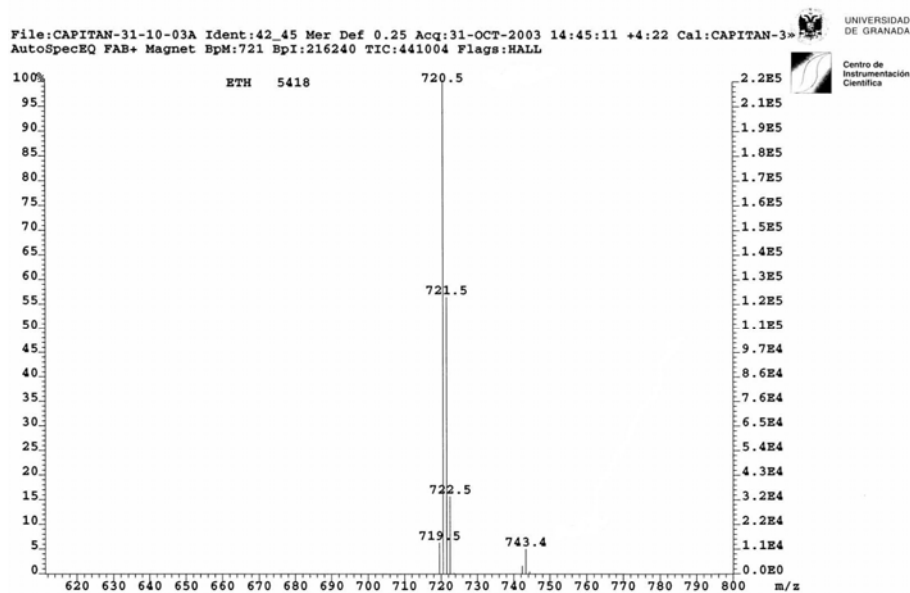


Figura A.10. HR MS (FAB +) de ETH 5418 calculado para $\text{C}_{38}\text{H}_{60}\text{N}_4\text{O}_8\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]$ 723,4308. Encontrado 723,4312.

El espectro de masas (FAB+) (Figura A.10) es concordante con la fórmula molecular esperada $C_{45}H_{57}N_3O_5Na$ ($M + Na$)⁺ e indica que la reacción entre las especies (VI) y (VII) se ha dado con éxito para la obtención del ETH 5418 (VIII).

En el espectro de ¹H-RMN (Figura A.11) las señales que aparecen entre δ 9 y 6 ppm corresponden a los hidrógenos de los anillos aromáticos, a δ 4,85 ppm aparece un quintuplete que corresponde al hidrógeno del carbono adyacente al oxígeno del grupo ester (**CH₂-COO-CH**), a δ 4,25 ppm resuena un triplete correspondiente a los hidrógenos del metileno adyacente al oxígeno del otro grupo ester (**COO-CH₂-(CH₂)₉**), a δ 3 ppm aparece un singulete correspondiente a los hidrógenos de los dos grupos metilo unidos a N, a δ 2,25 ppm aparece un triplete que corresponde a los hidrógenos del metileno adyacente al carbono del grupo ester (**CH₂-COO-CH**), los multipletes que aparecen entre δ 1,90 y 1,15 ppm corresponden a los hidrógenos de los demás grupos metilénicos presentes en la molécula y por último, los hidrógenos de los otros dos grupos metilo resuenan como un triplete a δ 0,90 ppm.

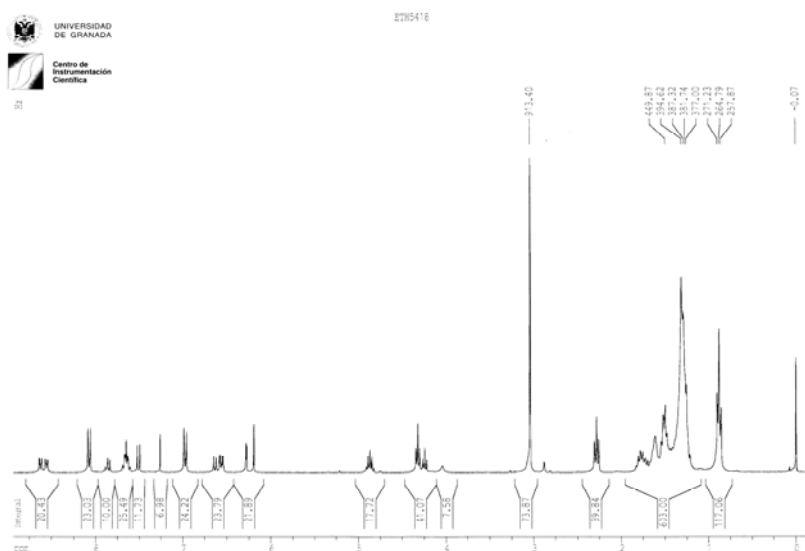


Figura A.11. Espectro ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) de ETH 5418 (VIII).

El espectro del ^{13}C -RMN (Figura A.12) presenta como señales significativas la que aparece a δ 173,7 ppm correspondiente a los carbonos de los grupos ester, las señales entre δ 170 y 90 ppm corresponden a los carbonos de los anillos aromáticos, a δ 74,1 ppm aparece el CH-O, a δ 64,9 ppm aparece el $\text{CH}_2\text{-O}$, a δ 40,3 ppm aparecen los metilos unidos a N, las señales entre δ 34,8 y 22,7 ppm corresponden a los demás carbonos metilénicos presentes en la molécula y la señal que aparece a δ 14,0 ppm corresponde a los carbonos de los otros dos grupos metilo.

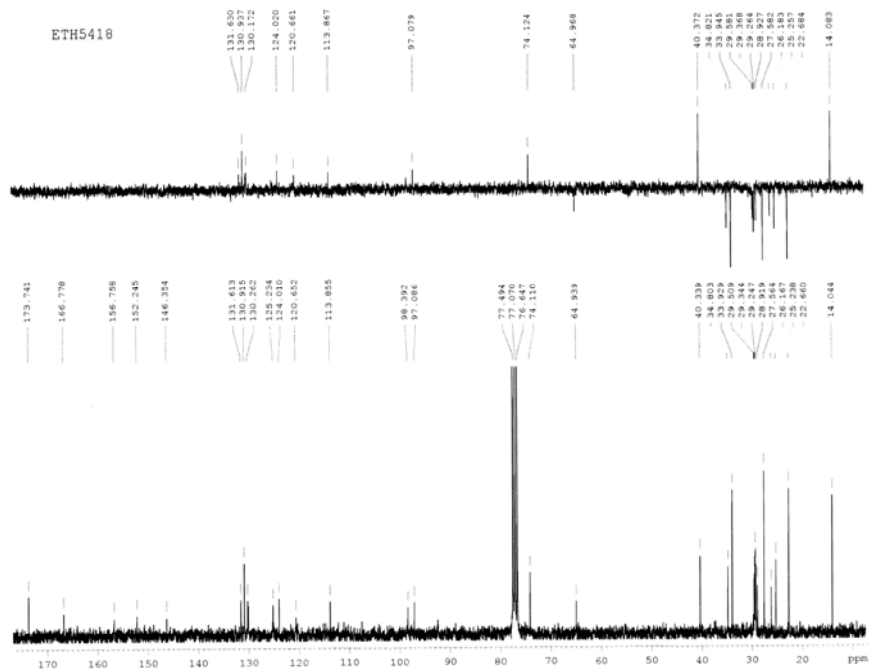


Figura A.12. Espectro ^{13}C -NMR (CDCl_3 , 100 MHz) de ETH 5418 (VIII).

Bibliografia

- [1] E. Bakker, M. Lerchi, T. Rosatzin, B. Rusterholz, W. Simon, *Anal. Chim. Acta*, 278, 211-225 (1993).

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en los estudios realizados en esta Tesis Doctoral nos han llevado a las siguientes conclusiones:

1. Se ha desarrollado diferentes estrategias para la determinación de metales pesados mediante el empleo de sensores ópticos de un solo uso basados en técnicas luminiscentes.
2. Se ha desarrollado un sensor óptico para la determinación de cobre basado en la formación de un complejo y su posterior medida de absorbancia aplicándose en muestras de plasma humano mediante el diseño de un sensor bicapa.
3. La forma de obtener la función de calibrado se ha realizado a través de una función spline, de esta forma es posible obtener una sensibilidad adecuada al tipo de problema que se nos presente. En la Tabla 1 se muestran los resultados obtenidos:

Tabla 1. Parámetros analíticos a diferentes tiempos de equilibración.

Parámetros	Unidades	Tira reactiva monocapa				Tira reactiva bicapa		
		5 min	15 min	30 min	60 min	15 min	30 min	60 min
Ordenada en el origen	---	$8,65 \times 10^{-3}$	$8,9 \times 10^{-3}$	0,0190	0,0618	0,037	0,075	0,017
Pendiente	$\text{mg}^{-1} \cdot \text{L}$	0,0285	0,111	0,1986	0,2410	0,067	0,074	0,298
Test de fallo de ajuste	%	15,75	13,53	93,24	43,99	29,16	7,51	40,37
Rango dinámico lineal	$\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	0,3 – 5,0	0,07 - 4,0	0,04 – 2,0	0,03 - 2,0	0,44 -5,0	0,27-5,0	0,05-1,0
Límite de detección	$\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	0,059	0,020	0,011	0,009	0,134	0,080	0,015
Límite de cuantificación	$\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	0,263	0,067	0,037	0,031	0,447	0,270	0,050
DER*	%	4,3	4,8	5,1	4,2	6,41	5,82	7,80

4. Se ha establecido un sensor óptico de un solo uso para la determinación de mercurio basado en un sistema ionóforo-cromoionóforo, realizando para ello un estudio por-

menorizado de diferentes ionóforos y plastificantes. En la tabla 2 se recogen los datos relativos al estudio de selectividad:

Tabla 2. Valores de los coeficientes de selectividad calculados por el método de las disoluciones separadas para Hg (II) a pH 4,7.

R/L	$-\log K_{\text{Hg,K}}$	$-\log K_{\text{Hg,Na}}$	$-\log K_{\text{Hg,Ca}}$	$-\log K_{\text{Hg,Mg}}$	$-\log K_{\text{Hg,Cd}}$	$-\log K_{\text{Hg,Zn}}$	$-\log K_{\text{Hg,Fe}}$	$-\log K_{\text{Hg,Pb}}$	$-\log K_{\text{Hg,Ni}}$	$-\log K_{\text{Hg,Cu}}$
1:1	-5,04	-4,28	-2,94	-4,19	-3,59	-	-2,92	-3,91	-3,65	-
1,5:1	-3,58	-3,56	-1,28	-2,65	-2,24	-2,69	-3,18	-3,05	-2,51	-2,92
2:1	-3,40	-2,19	-0,41	-1,62	-1,47	-1,95	-2,34	-2,85	-2,25	-2,38
2,5:1	-3,91	-2,70	-1,07	-2,29	-1,95	-2,21	-2,31	-2,72	-2,36	-2,34

- Se ha desarrollado un sensor óptico de un solo uso para la determinación de cobre basado en el proceso de transferencia de energía de resonancia que tiene lugar entre un complejo del metal pesado, Zincon-Cu (II) y un donador fluorescente, TP. El límite de detección de este sensor es de $2,5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 54 veces más bajo que el límite de detección de la anterior estrategia de determinación de cobre en plasma basada en complejación convencional.
- Se ha establecido el modelo teórico que describe el mecanismo de respuesta de este sensor óptico.
- Se ha preparado una tira reactiva irreversible para la determinación de mercurio basada en la variación de la intensidad luminiscente de un fluoróforo protón selectivo, TPP, inducida por la descomposición de un anión tetraarilborato provocada por dicho metal. La reproducibilidad encontrada en la preparación del sensor es del 7% ($n=36$) expresada en términos de intensidad de fluorescencia inicial de las membranas preparadas.
- Para este último tipo de sensor también se ha establecido el modelo teórico correspondiente al esquema de sensado.

-
9. Se ha puesto a punto un método en disolución para la determinación de cobre basado en la atenuación de fluorescencia de un complejo luminiscente por parte de dicho metal pesado. Las medidas se realizan en microplacas, lo que hace que el sistema sea rápido, pudiéndose analizar un elevado número de muestras de forma simultánea.
 10. Se han empleado diversas formas de medida: cámara CCD, lector de microplacas y espectrómetro de tiempos de vida basado en la técnica Time Correlated Single Photon Counting.

PUBLICACIONES

SUMMARY

Interest in chemical analysis test methods has been growing consistently over the last few years as an alternative to conventional chemical analysis for obtaining chemical information rapidly, simply and cheaply. There are very different approaches to this type of device that come from different fields, but all share the necessity of having rapid analytical systems that are independent from the usual requirements for analysis (sampling, sample treatment, instrumentation, skilled personnel, laboratory).

Among different test methods, disposable sensors, also known as one-shot sensors, stand out. These can be defined as miniaturized self-contained analytical devices that respond to the presence or concentration of an analyte, usually through a chemical or biochemical reaction. The reagents needed to trigger the reactions and processes that lead to the answer are incorporated in the element itself, usually in a dry format, in a form that makes it unnecessary to prepare, dispense or mix the needed reagents or perform operations like reaction, extraction, precipitation, dialysis, etc.

These assays are based on the integration of four analytical operations: derivatization, preconcentration, separation and measurement, and are carried out using an insoluble solid phase that contains reagents immobilized on a support. In this way it is only necessary to place the problem in contact with the analytical element by immersion, passing it through or deposit. Subsequent measurement or observation of the appropriate property (electrical, optical, mass, or another) conducted over this same solid support makes it possible to determine the concentration.

Typical applications of disposable sensors are: a] health care, not only in the clinical laboratory, but also as point-of-care or home testing for screening within the framework of routine examinations, treatment monitoring, patient self-monitoring, and general preventive medicine; b] safety protection in the field or factory; c] screening to sort critical samples; d] process monitoring through on-site measurement; e] designing analysis strategies using the rapid estimation of analyte levels; f] on-site analysis for labile samples; and g] making quick decisions in critical situations.

Heavy metals make up one group of analytes for which a large number of disposable sensors does not exist, both for reasons of sensitivity and selectivity, especially in the environment field. The main problems with heavy metal determination in environmental and biological samples are related with: the low concentration level, usual complex mixture of different metal ions and usual presence of different chemical species for the same metal.

This thesis is concerned with the development of disposable sensors for heavy metals with the characteristics of quantitative determination of the metals and based on the measurement of optical properties by transmission from transparent disposable sensors.

As target heavy metals we selected two with very different properties and toxicological characteristics: copper (II) and mercury (II). For the determination of these analytes we applied different sensing schemes based on metal recognition through conventional chromogenic reagents or, alternatively, by ionophores and subsequent transduction by absorption of radiation or luminescent emission. The recognition and transduction steps were combined in different ways in order to improve both selectivity and sensitivity.

The following strategies were devised, developed and implemented for the particular metal ions selected.

a) Use of a conventional reagent for metal ions, mainly based on complexation reactions, immobilized in a polymeric membrane. The drawbacks that the usual high negative variation of free energy associated with such reactions that lead to irreversible reactions lead to in sensors do not pose a problem in the disposable sensor format and could even provide the extra benefit of analyte preconcentration. The role for membrane polymers is immobilizing reagents and products.

A disposable sensor based on the use of the chromogenic reagent bathocuproine along with a reducing agent was studied to determine Cu (II) in plasma. In this case, the reaction produces a change of color in the sensing zone of the disposable sensor, which makes possible to quantify the copper concentration by direct absorption measurements. The sulfonic polyfluorinated hydrocarbon Nafion is used as polymer membrane to retain the reagents and the formed Cu(I) complex.

b) Use of a conventional chromogenic reagent, but changing the absorption-based measurement by fluorescence through resonance energy transfer with a luminophore, with the goal of improving sensitivity and selectivity by using a more sensitive technique than that of conventional reagents.

This strategy was implemented in a disposable sensor for Cu (II) for use in natural waters which requires the presence of two dyes distributed homogeneously in the membrane, one acting as the copper-sensitive reagent, the chromogenic reagent zincon, which produces the acceptor species, and the other as the analyte-independent donor, a porphyrazine, whose luminescent emission is modulated by varying the amount of Cu (II). In this case, the membrane polymer not only makes physical retention of reagents possible, but also restricts the free entrance of ions by its lipophilicity, working through an ion-exchange mechanism due to the presence of lipophilic cations in the bulk membrane.

c) Use of an ionophore able to complex the metal ion as the recognition reagent in the membrane. Since this reaction does not produce any change in the optical properties of the membrane, an acid-base type transduction reaction is coupled based on an ion-exchange process between the metal ion present in the solution and protons present in the membrane ruled by the metal ion-ionophore interaction. The membrane must hold all the lipophilic reagents, allow diffusion through it and have ion-exchange properties. This strategy was accomplished for mercury (II) using an aza-substituted crown ether with a ring size of 12 as ionophore and a phenoxazine derivative as chromoionophore in PVC membrane.

d) Selective recognition that does not use conventional chromogenic reagent or ionophores, but a reagent that selectively reacts with the metal ion. This event, which does not produce an optical change, is monitored by coupling a proton-selective fluoroionophore in membrane through an electroneutrality condition. This sensing scheme was implemented for mercury (II) in a disposable membrane composed of plasticized PVC which incorporates a tetraarylborate salt as Hg (II) selective recognition reagent and a porphyrin proton-selective fluoroionophore as the optical transducer. It is based on the decomposition of tetraarylborate anion induced by Hg(II) taken by the membrane which compels the deprotonation of the porphyrin fluoroionophore, recovering its fluorescence.

e) The selective interaction of a metal ion with a reagent produces a quenching of luminescence. Obviously, in this case it is not necessary to couple a transduction reaction. This scheme has been tested for copper (II) determination based on its interaction with the ternary complex europium-tetracycline-hydrogen peroxide which genders a quenching of fluorescence due to both static and dynamic quenching. This scheme was implemented in microtiter plates and not in the membrane format as usual in the above strategies, with the intention of trying other test method types.

Comparing the different characteristics of the different developed disposable sensors, one can conclude that:

In all cases, an increase in the equilibration time produces an increase in the sensitivity of the disposable sensor. Thus, an increase from 5 to 60 min, 12 times, in the disposable sensor for Hg (II) using the aza-substituted crown ether ionophore, decreases the detection limit 30 times. In the case of a Cu (II) disposable sensor based in bathocuproine, an increase from 15 to 60 min means a decrease of 8.8 times the quantification limit.

Sensors based on luminiscence measurements are more sensitive (one or two magnitude orders) than sensors based on absorbance measurements. As an example, the Cu (II) sensor based on zincon but measuring fluorescence through a RET process shows a detection limit 54 times lower than the detection limit of the procedure based on disposable sensors based on bathocuproine.

All sensors present good selectivity against another metal ions and anions and emphasis must be placed only on a serious interferent found for the disposable sensor developed for mercury determination based on tetraarylborate decomposition produced by chloride, because mercury must be free to enter the membrane as an ion. In other cases, interference problems could be solved by placing a second layer over the sensing one, as is the case with protein interference in copper determination in plasma. Some strategies seem to be less selective, as is the case with the Cu (II) procedure based on quenching and implemented in microtiter plates.

LIST OF ORIGINAL PAPERS

This thesis is based on the following papers:

1. *A multilayer optical test strip for copper determination in human plasma.* Analytical Letters, 35(4), 615-633 (2002).
2. *Fluorescence resonance energy transfer disposable sensor for copper (II).* Sended to Analytica Chimica Acta.
3. *Irreversible optical test strip for mercury determination based on neutral ionophore.* Analytica Chimica Acta, 524, 365-372 (2004).
4. *Irreversible optical sensor for mercury determination based on tetraarylborate decomposition.* Sended to Sensors and Actuators B.
5. *Fluorescence quenching of the europium tetracycline hydrogen peroxide complex by copper (II) and other metal ions.* Sended to Applied Spectroscopy.

CHEMICAL AND BIO-SENSORS

**A MULTILAYER OPTICAL TEST
STRIP FOR COPPER
DETERMINATION IN HUMAN
PLASMA**

**L. F. Capitán-Vallvey,^{1,*} C. Cano-Raya,¹
C. Esparza del Valle,¹ M. D. Fernández Ramos,¹
I. de Orbe-Payá,¹ R. Avidad,¹ and
V. Ramírez González²**

¹Department of Analytical Chemistry, ²Department
of Applied Mathematics, University of Granada,
Granada 18071, Spain

ABSTRACT

A new procedure to determine copper has been proposed using an irreversible and disposable multilayer optical test strip. Two layers form the sensing zone: a copper sensitive and a dialysis layer. The test strip is characterised to be a disposable polyester sheet contained in a circular film 6 mm in diameter and 25 μm in thickness, with all reagents necessary to produce a selective response. The sensing zone was formed by Nafion as polymer, bathocuproine as a chromogenic reagent and *p*-anisidine as reducer. When it is applied to determination of copper in plasma samples, another layer of hydrogel D-6 is put on this membrane to eliminate the inter-

*Corresponding author. Fax: 31 + 958 243328; E-mail: lcapitan@ugr.es

ference of proteins. When the test strip was introduced for 60 min into a plasma sample an orange colour developed. The absorbance at 475 nm was used as the analytical signal. The test strip responded linearly in the range 0.05–1.00 mg L⁻¹. The reproducibility in the measurement of copper at 3.0 mg L⁻¹, was 7.8%. The procedure was applied to the determination of copper in different samples of plasma validating results against a reference method used in clinical laboratory. The method is simple, inexpensive, selective and sensitive.

Key Words: Copper determination; Strip test; Single-use optical sensor; Human plasma analysis

INTRODUCTION

One of the current trends in analytical methodology research is the simplification of the analytical procedure, which permits the user or client to obtain chemical information wherever needed.

Test methods, or test kits, for chemical analysis (1) provide one potential means of analysis that is rapid, simple and, usually, inexpensive, and enables the detection and/or determination of analytes without trained personnel, sample treatment, use of complicated laboratory equipment and instrumentation, or the laboratory itself (2).

Test methods are specially adapted analytical methods, both reactions and processes, and consist of a chemical, biochemical or immunological reaction along with a system for evaluation, that are well fitted to each other. They use some visually observable effect, usually a comparison with a colour chart or other easily measurable method (colorimetric, photometric, reflectometric, titrimetric, enzymatic assays, immunoassays and bio tests).

Of the different types of chemical tests, the methods that use a solid matrix as a support (cellulose, synthetic polymers, glass, ceramics, and others) are probably those that are most interesting on a practical level (test strips, test sticks, test papers, drop planar sensors or single-use sensors). With these types of tests, the reagents are immobilised on the surface or in the bulk of the solid support by means of a physical (evaporation, adsorption, etc) or chemical (covalent binding) procedure, and the analytical signal is developed during the time of contact between the strip and the sample solution. There are a large number of these tests, some of them commercially available, for the determination of chemicals with analytical or clinical interest (Dry Reagent Chemistries (3)), such as the express

tests for the determination of glucose, proteins, enzymes, or metals (4–7) among others.

The analysis of the total amount of metallic ions present in biological samples presents two main problems: first, low level and distribution between different chemical species and, second, the high interference level coming from concomitants present in the matrix.

Here, the use of reactions with conventional chromogenic reagents, which is inconvenient for use in flow sensors, as these usually have high stability constants and create irreversible sensors, could provide a good alternative to test strips or planar drop sensors. This is especially true due to a high variation of free energy which means that the use of the above reagents could displace the different equilibriums involved and produce a preconcentration effect which can give it the sensitivity necessary for its use.

A multilayer design that allows for different analytical processes like size exclusion, charge exclusion, polarity and mixed control could solve the interference problem (8). In addition the multilayer design can achieve other goals as well through the use of a reflection layer, radiation blocking layer, barrier layer, registration layer, migration inhibition layer, scintillation layer, scavenging layer and destructive pod-like member layer (9).

Usually the most test strip procedures are based on diffuse reflectance measurements of an opaque reagent zone that contains the assay reagents in thin films, paper matrices and other synthetic porous materials built on an opaque substrate (10–12). Several attempts were made to prepare transparent test strips that absorb liquids by use of a film-forming polymer and a water-swellaable component (13). However, in optical sensors it is possible to build the layers on a transparent substrate (14).

We used in this work the methodology of bulk membranes (15) to develop a transparent disposable base for the test strip. From this, our research group proposed quantitative test strip methods for the determination in natural waters of zinc (16), iron (17), calcium (18), nitrite (19), nalidixic acid (20) and the pesticide morestan (21).

For this paper we have studied a transparent multilayer test strip for the determination of the total amount of copper in human serum. Copper is a necessary element for the normal functioning of the human body, $1.0\text{--}1.5\text{ mg L}^{-1}$ being the normal concentration in human plasma. However, a concentration higher than 1.5 mg L^{-1} in the blood starts to be toxic and a concentration over 5.4 mg L^{-1} produces irreversible renal, intestinal, and hepatic injuries that can produce death if the ingested amount of copper is 1.0 g or more (22). Hence, the research and development of rapid and selective analytical methods for the determination of copper in human blood is important.

In this paper, we propose a new procedure to determine total copper ((I) and (II)) by a test strip, that could be considered a non-continuous and disposable optical sensor, which is a sheet of polyester with a micro zone that contains the chemistries needed to selectively respond to copper by modifying its colour.

The test strip proposed for quantitative copper determination is based on the use of a well-known cuproine type reagent, namely bathocuproine, because it is more selective than other usual copper reagents (23,24). This reagent forms a cationic complex with Cu(I) between pH 4 and 8, extractable with pentyl alcohols or *n*-hexanol (molar absorptivity in isoamyl alcohol $1.42 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ and $1.39 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ in water (25).

The procedure used here is based on the selective and irreversible redox reaction between Cu(II) and *p*-anisidine, and the complexation by bathocuproine of the Cu(I) produced in the sensing zone, and the direct measurement of the absorbance. All of the experimental variables that influence the system have been studied and the interferences coming from proteins could be eliminated by placing a dialysis membrane on the copper sensitive layer. The proposed method for copper determination in human serum is quick, inexpensive, selective and sensitive, and uses only conventional instrumentation.

As a precedent we could cite that T. Saito (26) has proposed a method for the determination of copper(II) based on the use of a sheet of PVC containing bathocuproine as a reagent and NPOE as plasticizer, but this process requires the previous addition of hydroxylammonium sulphate as reducer and picrate as a counterion to the solution containing the analyte. Bathocuproine loaded into Nafion has been used for a test strip procedure for semiquantitative determination, without the use of spectrophotometer, of Cu(I) level in seawater coming from antifouling paint on hulls of boats (27) and also for Cu(I) determination with a flow-through optical sensor that use bathocuproine immobilised into a Nafion film (28).

EXPERIMENTAL

Apparatus and Software

Absorbance measurements were performed with a Perkin-Elmer Lambda-2 (Nortwalk, CT, USA) spectrophotometer interfaced to an IBM SX-486 microcomputer. For the acquisition and manipulation of the spectral data, the PECSS software package supplied by Perkin-Elmer was used. The absorbance measurements were performed using the home-made cell

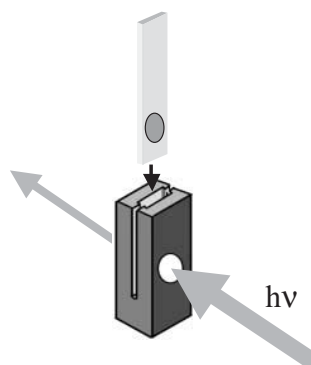


Figure 1. Homemade support to measure the absorbance of the test strip.

holder shown in Figure 1. This accessory was constructed with a black painted prismatic block of iron with a circular hole (4 mm in diameter) that delimits the surface of the light beam and avoids the possible refraction phenomena produced in the border of the sensing zone. Other apparatus and laboratory materials also used were a laboratory-made spin on device (29), a Crison (Crison Instruments, Barcelona, Spain) digital pH-meter with combined glass-saturated electrode. Software programs used for the treatment of the data were: Statgraphics software package, ver.6.0 STSC Inc. Statistical Graphics Corporations, USA, 1993.

Reagents and Materials

Copper stock solution (1.000 mg L^{-1}) was prepared from metallic copper (Merck, Darmstadt, Germany) by solution in the necessary amount of conc. HNO_3 (final pH 1.8). Solutions of lower concentration were prepared by dilution with water. Bathocuproine (2,9-dimethyl-4,7-diphenyl-1,10-phenantroline); Nafion[®] 5% wt/wt solution in a mixture of aliphatic alcohols; *p*-anisidine, and absolute ethanol all from Sigma (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, Spain). Other reagents and materials also used were the following: sheets of polyester Mylar (Goodfellow, Cambridge, UK), D-6 polyurethane hydrogel from Tyndall-Plains-Hunter Ltd (Ringo, New Jersey, USA) and standard solutions of Fe(III), Sr(II) and Ba(II) as nitrates, Mg(II) and Zn(II) as chlorides, SO_4^{2-} , ClO_4^- , HCO_3^- and Cl^- as sodium salts and NO_3^- as potassium salt (Merck, Darmstad, Germany) and horse serum certificate supplied by Life Technologies B.V. (Breda, Haarlem, NDL). All chemicals used were of analytical reagent grade. Reverse-osmosis

type quality water (Milli-RO 12 plus Milli-Q station from Millipore) was used throughout. As a reference method for comparison purposes we used the Boehringer Mannheim method for the determination of copper in serum (MPR1) that uses bathocuproine disulfonated as reagent.

Membrane Preparation

The sensing membrane is formed by two layers: a copper-sensitive internal layer and an dialysating external layer. The solutions used in the preparation of the disposable sensor's layers were fabricated as follows: a) Internal layer: 2.0 mg of bathocuproine and 0.6 mg of *p*-anisidine dissolved in 0.5 mL of Nafion. b) External layer: 0.214 g of D-6 hydrogel dissolved in 4 ml of a 90% ethanol: water mixture. The membrane was prepared in a laboratory-made spin-on device (29) using 20 μ l of first mixture placed into a sheet of polyester (4×1.4 cm). When this first layer had solidified, left in a dark place, 20 μ L of the second mixture was placed over it in the same way and the membrane was left in the dark to dry.

The sensing membrane exhibits the following physical characteristics: solid and homogeneous 6 mm in diameter circular film, transparent and colourless, well adhered to the solid support. The resulting dry internal layer was calculated to have a thickness of about 15 μ m and the external one about 1 μ m.

Absorbance Measurements

The analytical parameter was an absorbance measured at 475 nm against a blank membrane equilibrated with all reagents except copper. The absorbance measurements were obtained with the use of the cell holder described above, which improves its reproducibility, so that it is measured in a zone with a constant diameter (4 mm), which is less than the diameter of the active zone of the sensor (6 mm), thus avoiding any possible irregularities that are produced on the edges of the membrane as a consequence of the drying.

Procedure for Samples and Standards

A 50 mL aliquot of aqueous standard solution containing between 0.05–1.00 mg L^{-1} of copper was placed in a 100 mL glass vessel and then 0.25 mL of pH 4.5, 1 M acetic acid/sodium acetate buffer solution was

added. In the case of the serum samples, 1 mL of serum diluted to 50 mL was treated in the same way. Each solution was introduced in a bottle with a lid containing the test strip and was stirred in a vibrating agitator for 60 min at room temperature. Next, the membrane was pulled out from the solution, wiped to remove any solution droplets and its absorbance measured as described in the *Absorbance Measurements* section. All measurements were carried out at room temperature. The membranes were not conditioned before use.

RESULTS AND DISCUSSION

Experimental Parameters

The parameters that potentially can influence the optical response of the test strip can be classified in two groups: a) Parameters related to the composition of the membrane (nature and proportions of the cocktail components, volume of cocktail and conditions used for membrane making, b) Parameters related to the equilibration process between the sample solution and the membrane (pH and ionic strength and time of contact).

Membrane Composition

The first aspect to consider was the selection of the reagents used for the two layers of the sensing membrane. The reagents that form the first layer are as follows: a chromogenic reagent for the formation of a coloured complex with copper; a reagent capable of reducing Cu(II) to Cu(I) and a polymeric solid support that incorporates the rest of the reagents and retains the copper-chromogenic reagent complex when formed. The second layer must contain a reagent capable of retaining the proteins that are potentially present in the real samples because they can interfere with the formation of the Cu-complex.

As a chromogenic reagent for copper we selected bathocuproine (BC) because it forms a highly coloured complex with copper that possesses a high reactivity, sensitivity and selectivity for this ion (25). As the copper in the complex is univalent and its stoichiometry is 1 : 2, $[\text{CuL}_2]^+$, its extraction as a positively charged complex into the membrane requires the presence of discrete lipophilic anions in the bulk membrane or the use of negatively charged polymer to retain the complex as an ion pair. The first approach was not successful because the membranes were prone to leaching components, resulting in low reproducibility. So, we opted for

the second way and selected Nafion as polymer for the formation of the membrane (30).

As the oxidation state of copper in the complex is univalent and in the human serum is Cu(II), present as different copper compounds (ceruloplasmin, transcuprein, albumin, cytochromo C oxidase, lysyl oxidase, Cu-Zn dismutase) (31), it is necessary to reduce the copper before the formation of the complex. To carry out this process we tested incorporation of several reducers in the membrane, but *p*-anisidine was the only reagent capable of reducing Cu(II) in our experimental conditions and, consequently, was selected.

To optimise the proportion of the membrane constituents (BC, *p*-anisidine and Nafion), several sensors were constructed with 0.5 mL of Nafion, a constant amount of one component, and variable amounts of the other components. In all cases, 0.5 mL of Nafion was used because we have proved that the amount of this chemical does not influence the analytical signal developed in the membrane. The different cocktails prepared contained amounts of *p*-anisidine ranged between 0.5 and 5.0 mg and BC between 1.0 and 4.0 mg. It was found that amounts of BC higher than 2.5 mg and/or amounts of *p*-anisidine higher than 3.0 mg, made the membrane opaque, impeding its use as test strip. Figure 2 shows the response of different membranes to 2 mg L^{-1} of Cu(II), indicating that 0.6 mg of *p*-anisidine and 2 mg of BC are adequate amounts for membrane making.

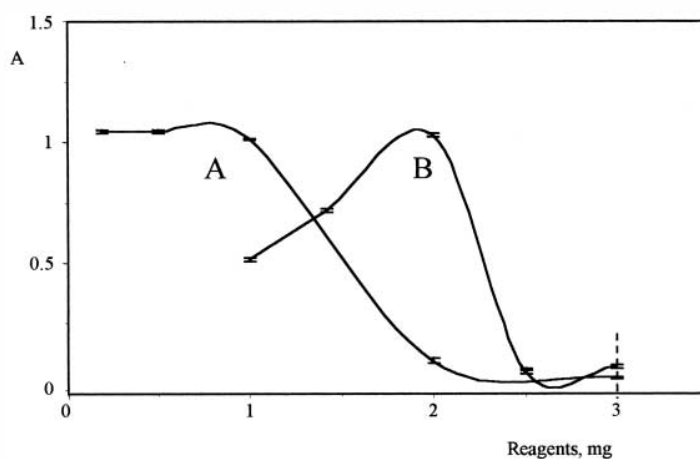


Figure 2. Influence of amount of bathocuproine (A) and *p*-anisidine (B) on the membrane composition.

Other parameters related to the preparation of the test strip that could influence its response to copper are the volumes of cocktail placed on the support and the drying time. We use 20 μL of cocktail the maximum amount allowed by the support and 30 min at room conditions to dry.

Reaction Parameters

As a consequence of the reaction of the colourless copper sensitive membrane with the analyte, an orange colour was developed with maximum at 475 nm. The maximum values found in the literature for this complex are similar, 479 nm in isoamyl alcohol (25) and 480 nm as picrate ion pair in PVC membrane (26).

The experimental parameters of the equilibration process that could influence the disposable sensor response are the following: pH, ionic strength and volume of the sample solution, and time and speed of agitation of the above mentioned solution in contact with the strip.

The influence of pH is analogous to the observation made by Saito when using PVC membranes to retain the complex as ion-pair with picrate (26), a plateau between 4 to 8 and decreasing at both sides. Consequently, to avoid any influence by the pH of the actual sample solutions on the analytical signal, a 1 M acetic acid/sodium acetate buffer solution (pH 4.5) was used to prepare standards and samples. The influence of ionic strength on the membrane response, adjusted with NaCl, is very small until 0.02 M (2.8% of decrease) decreasing 17.4% at 0.1 M.

The influence of the volume of the sample was studied for volume values ranging from 5.0 to 500.0 mL (3.0 mg L^{-1} on copper). An increase of 30% in the analytical signal was observed when the volume grows from 5.0 to 50.0 mL. Between 50.0 and 500.0 mL of sample volume, this increase was very small (7%), hence 50.0 mL was selected as the working volume for the next experiments. However, the use of different sample volumes makes it possible to adapt procedures to cover as wide a concentration range as required. Consequently, the sensitivity could vary with the sample volume used, as is characteristic of this type of test strip.

In previous papers (17,19–21) we have observed that with this type of test strip, the equilibration time necessary for the development of the analytical signal is variable depending on the concentration level of the analyte in the sample. So, we studied the time course of the reaction of copper response of the test strip at several concentrations ranging from 0.5 to 15.0 mg L^{-1} . As seen in Figure 3, the rate increases with higher Cu(II) concentrations. An increase in the reaction time would enable the detection of low copper concentrations.

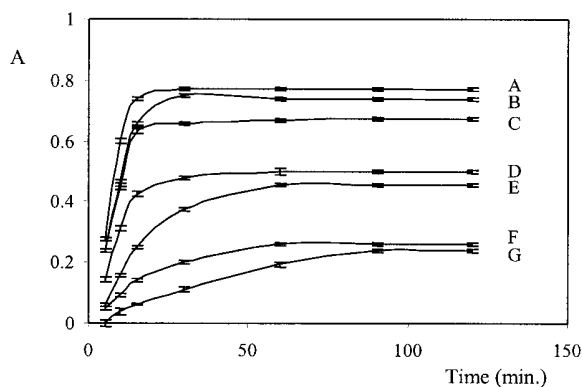


Figure 3. Influence of time course of the test strip response for different amounts of copper: A) 15 mg L^{-1} ; B) 10 mg L^{-1} ; C) 5 mg L^{-1} ; D) 4 mg L^{-1} ; E) 2 mg L^{-1} ; F) 1 mg L^{-1} ; G) 0.5 mg L^{-1} .

In order to generate a result within an adequate amount of time, it is necessary to agitate the solution with the membrane. Different methods of agitation were tried (magnetic stirrer, rotating and vibrating agitator) and it was found that the best results, i.e., a homogenous colour in the membrane, were achieved with a vibrating agitator operating at 700 oscillations a minute.

Influence of Copper Concentration

We have observed that if the analyte concentration is higher than 5 mg L^{-1} the equilibration time can be as little as 5 min, whereas if the concentration is around $5 \mu\text{g L}^{-1}$, 1 h or more is needed. Hence, both experimental variables, concentration and equilibration time, are closely connected and the optimisation of analytical range and equilibration time must be simultaneously carried out.

Taking into account the results of the previous experiment we can say that the analytical signal can be expressed as a function of two variables: $A = f(C, t)$, where the absorbance A is a continue and strictly increases function in each one of the two variables C and t , that are, respectively, the concentration of analyte in the solution and the equilibration time. If we obtain this calibration function $f(C, t)$ we can choose the optimal equilibration time to estimate, with the maximum sensitivity possible, the concentration of analyte in the sample. In order to simplify the mathematical

Table 1. Absorbance as a Function of the Total Copper Concentration and Equilibration Time

Time (min)	[Cu] $\mu\text{g mL}^{-1}$					
	0.5	1.0	2.0	4.0	5.0	10.0
5	0.0000	0.0500	0.0625	0.1437	0.2375	0.2378
10	0.0375	0.0930	0.1562	0.3125	0.4437	0.4687
15	0.0625	0.1437	0.2500	0.4250	0.6312	0.6562
30	0.1000	0.2000	0.3750	0.4564	0.6562	0.7300
60	0.1950	0.2625	0.4562	0.5000	0.6687	0.7375
90	0.2375	0.2625	0.4562	0.5000	0.6750	0.7375
120	0.2375	0.2625	0.4562	0.5000	0.6751	0.7374

procedure needed to obtain this calibration function, we have to admit that the function $f(C, t)$ can be substituted by a interpolation spline function $s(C, t)$, which is a function consisting of polynomial pieces on subintervals, joined together with certain smoothness conditions (32). In each subinterval $C_i \leq C \leq C_{i+1}$ and $t_j \leq t \leq t_{j+1}$ the interpolant spline can be obtained by applying the equation (I) (33) to the experimental data $A_{i,j}$, $A_{i,j+1}$, $A_{i+1,j}$ and $A_{i+1,j+1}$ contained in Table 1. This spline is an acceptable approximation of the calibration function $f(C, t)$ because it is also a continuous and strictly increasing function in each variable C and t and interpolates all experimental data (20).

$$s(C, t) = A_{ij} \frac{(C - C_{i+1})(t - t_{j+1})}{(C_i - C_{i+1})(t_j - t_{j+1})} + A_{i,j+1} \frac{(C - C_{i+1})(t - t_j)}{(C_i - C_{i+1})(t_{j+1} - t_j)} \\ + A_{i+1,j} \frac{(C - C_i)(t - t_{j+1})}{(C_{i+1} - C_i)(t_j - t_{j+1})} + A_{i+1,j+1} \frac{(C - C_i)(t - t_j)}{(C_{i+1} - C_i)(t_{j+1} - t_j)} \quad (1)$$

In this expression i represents any value between 1 and n , j is any value between 1 and m , and A_{ij} is the experimental value of the absorbance corresponding to $C = C_i$ and $t = t_j$. Figure 4 shows the spatial plotting of the spline function obtained by means of the interpolation of the experimental data of the Table 1.

In order to select the optimal equilibration time to estimate the concentration of analyte we assumed that this time is that which produces a maximum increase in the analytical signal as a consequence of a determinate increasing of the analyte concentration, that is to say, the numerical derivative of $s(C, t_j)$ as a function of C , presents a maximum. To calculate this numerical derivative, we applied a known form of numerical derivation that

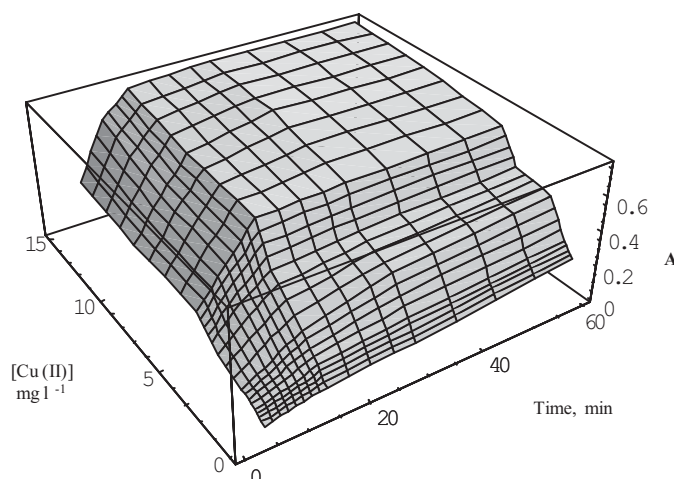


Figure 4. Spatial plotting of the interpolate spline function $s(C, t)$ corresponding to the experimental data of the Table 1.

allows for approximation of the derivative $g'(a)$ of a function $g(x)$ in a point $x = a$, when the values of the near points to $x = a$ are known. This numerical derivative can be calculated using the formula:

$$g'(a) \cong \frac{g(a+h) - g(a)}{h} \quad (2)$$

where $h \neq 0$ and $g(a+h)$ are values of the function in the point $a+h$ (32). By applying these expressions to the data of the Table 1, we obtained the data contained in Table 2.

To estimate the concentration of analyte (C_s) in a real sample, *a priori*, we selected the optimal equilibration time, t_j , for the intermediate concentration of the linear range of concentrations, then we measured the absorbance of the sample $A_s = A(C_s, t_j)$ at this selected time t_j . Finally we located the i index such that $A_{i,j} \leq A_s \leq A_{i+1,j}$ and using this value in the Eq. (1) we obtained an approximate value of C_s .

$$C_s = \frac{A_s(C_i - C_{i+1}) + A_{ij}C_{i+1} - A_{i+1,j}C_i}{A_{ij} - A_{i+1,j}} \quad (3)$$

If the time previously selected is not the most appropriate to measure the absorbance, we used the approximate value C_s to select the optimum time and then we measured the analytical signal of the sample.

Table 2. The Values of the Numerical Derivative of the $s(C, t)$ as a Function of the Concentration

Time (min)	Intervals [Cu] $\mu\text{g ml}^{-1}$				
	0.5–1.0	1.0–2.0	2.0–4.0	4.0–5.0	5.0–10.0
5	0.100	0.012	0.041	0.094	0.000
10	0.111	0.063	0.078	0.131	0.005
15	0.162	0.106	0.087	0.206	0.005
30	0.200	0.175	0.041	0.199	0.015
60	0.135	0.194	0.022	0.169	0.014
90	0.050	0.194	0.022	0.175	0.012
120	0.050	0.194	0.022	0.175	0.012

Analytical Parameters

Using the previously established conditions, several standards of copper, with concentration levels ranging between 0.005 and 30.0 mg L^{-1} , were equilibrated with the corresponding test strips at different intervals of time, namely 5, 10, 30 and 60 min. Each calibration curve was obtained from seven standards and three replicates of each one standard. The *lack-of-fit* test was applied to probe the linearity of these analytical curves as suggested by the Analytical Method Committee (34) and to establish the upper linearity level. The precision, expressed as relative standard deviation (RSD), was obtained from ten standards at 3 $\mu\text{g L}^{-1}$ concentration level of Cu(II) for 5, 10, 30 and 60 min respectively, and the IUPAC detection and quantification limits (35–37) were determined from ten blanks. As can be seen, the detection limit decreases as the contact time increases up to 30 min, but does not increase significantly from that point. Table 3 contains the figures of merit of the experimental data obtained in these experiences. The repeatability in the construction of the membranes was 4.3%. This parameter was determined as the relative standard deviation of six different membranes equilibrated with standard solutions of concentration 3 mg L^{-1} in Cu(II).

In order to test any effects that could potentially produce other species coexisting with copper we studied the interference of alkaline, alkali earth and common metallic ions and common anions. The only interfering ion is iron, both as 2+ or 3+ oxidation state, since when it is present at a level three times that of the copper, the membranes become a violet colour and they do not change in the presence of copper. The interference of proteins is so high that at concentrations higher than 100 mg L^{-1} , they completely impede the reaction with copper and the membrane does not colour.

Table 3. Analytical Parameters at Different Equilibration Times

Parameters	Units	Monolayer Test Strip (min)			Bilayer Test Strip (min)			
		5	15	30	60	15	30	60
Intercept	—	$8,646 \times 10^{-3}$	$8,49 \times 10^{-3}$	0.0190	0.0618	0.037	0.075	0.017
Slope	mg L ⁻¹	0.0285	0.111	0.1986	0.2410	0.067	0.074	0.298
Probability level (lack-of-fit test)	%	15.75	13.53	93.24	43.99	29.16	7.51	40.37
Linear range	mg L ⁻¹	0.3–5.0	0.07–4.0	0.04–2.0	0.03–2.0	0.44–5.00	0.27–5.00	0.05–1.00
Detection limit	mg L ⁻¹	0.059	0.020	0.011	0.009	0.134	0.080	0.015
Quantification limit	mg L ⁻¹	0.263	0.067	0.037	0.031	0.447	0.270	0.050
RSD*	%	4.3	4.8	5.1	4.2	6.41	5.82	7.80

*Ten replicates in all cases.

Application to Human Serum

In order to eliminate the interference of proteins present in human serum at a $60\text{--}78\text{ g L}^{-1}$ level (38), without the need to deproteinise, the copper sensitive layer was coated with a polymer used as a dialysis membrane. Different types of polymers were used to form the external layer of the sensor. From among all the chemicals tested (polyvinylacetate, chitosan, cellulose acetate and different types of polyurethane hydrogels) only the D6 polyurethane hydrogel produced good results. Test strips were prepared using volumes of 5.35% D6 hydrogel solution ranging between 5 and $30\text{ }\mu\text{L}$. In this range, and in the presence of a constant amount of Cu(II) and protein, an increase of the analytical signal was observed, until $15\text{ }\mu\text{L}$. So in the end, $20\text{ }\mu\text{L}$ of hydrogel solution was used to cover the membrane sensitive to copper, creating an optically transparent membrane.

Using the bilayer test strip described above, it was possible to eliminate the interference of protein at concentration levels lower than 2.6 g L^{-1} (Figure 5).

Analytical Performance of the Complete Test Strip

Table 3 shows the analytical characteristics of the complete disposable sensor, noting that the sensitivity decreases once the dialysating layer is situated, which then slightly decreases its reproducibility. Taking into account that the usual concentration of copper in serum or plasma of

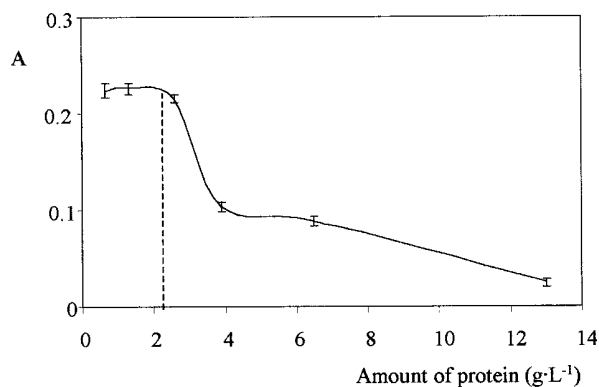


Figure 5. Influence of the amount of proteins in the response signal of copper test strip at 1 mg L^{-1} Cu(II) level.

Table 4. Determination of Copper in Different Human Serum Samples

	Proposed Method (mg L ⁻¹)	Reference Method (mg L ⁻¹)	T_{exp}	P_{val} (%)
Plasma pool-1	1.00 ± 0.07	1.01 ± 0.03	0.23	83.29
Plasma pool-2	1.47 ± 0.02	1.45 ± 0.04	0.77	49.79
Plasma pool-3	1.19 ± 0.09	1.16 ± 0.02	0.05	95.67
Plasma pool-4	0.79 ± 0.07	0.96 ± 0.05	0.46	69.06
Plasma pool-5	1.24 ± 0.05	1.23 ± 0.04	0.03	97.88

Three replicate samples in all cases.

healthy individuals ranges from 0.8 to 1.4 mg L⁻¹ (39) the optimum equilibration time for serum application, as we could see in Table 3, can be as much as 60 min.

Application of the Method

To check the applicability of the method to the determination of copper, different pools of human plasma were selected and tested. The method cannot be applied in cases where hemolysis exists. Table 4 shows the results obtained using the test strip proposed here and, as a reference method, the Boehringer Mannheim method for copper in serum (MPR1) that uses bathocuproine disulfonate after the deproteinisation of serum. Table 4 also includes the mean values from three determinations of one sample each, standard deviations of these measurements, the experimental value of Student's t test (t_{exp}) and the probability value (P_{val}) of the test used for the comparison of the measurements obtained for both methods is in all cases superior to 5%. As can be seen, the results obtained for both methods are statistically similar.

CONCLUSIONS

We have designed a single-use multilayer optical test strip which measures by transmission and offers enough good repeatability and a response time that is not excessively long and which can be considered as an inexpensive alternative to obtaining analytical information.

The test strip proposed here allows for the determination of copper in human serum samples and furthermore offers the advantage of not requiring

the elimination of the proteins present, the only sample treatment that is needed is a simple dilution of the serum. Results obtained indicate good accuracy and precision which, combined with its low cost, could make it useful for routine analysis with portable equipment. It is compatible with LED blue and could also be used with a colour chart for semiquantitative determination.

It should be noted that the proposed method could be inconvenient in that the test strip suffers from a limited lifetime, one month, which can always be alleviated by the use of some preservation system (an absence of light and low temperatures).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to the Ministerio de Educacion y Cultura, Dirección General de Enseñanza Superior (Spain) (Project No. PB98-1302) for financial support.

REFERENCES

1. Unger-Heumann, M. *Fresenius J. Anal. Chem.* **1996**, 354, 803.
2. Zolotov, Y. *Ann. Chim.* **1997**, 87, 285.
3. Walter, B. *Anal. Chem.* **1983**, 55, 498A.
4. Poppe, W.; van Rijokevorsel, R.; Rüppender, U.; Mache, H. U.S. Pat. No. 4,592,893, 1986.
5. Luo, S.; Lo, P.; Groger, H.P.; Churchill, R.J. U.S. Pat. No. 6,051,437, 2000.
6. Kutter, D. *Clin. Chim. Acta* **2000**, 297, 297.
7. Starp, H.; Buschmann, N.; Cammann, K. *Fresenius J. Anal. Chem.* **2000**, 368, 203.
8. Wang, J. In *Biosensors and Chemical Sensors*; Edelman, P.G., Wang, J., Eds.; American Chemical Society: Washington, DC, 1992; pp. 125.
9. Gleisner, J.M. U.S. Pat. No. 5,128,171, 1992.
10. Przybyłowicz, E.P.; Millikan, A.G. U.S. Pat. No. 3,992,158, 1976.
11. Adams, E.C.; Smeby, R.R. U.S. Pat. No. 3,092,465, 1963.
12. Charlton, S.C.; Walter, B. U.S. Pat. No. 4,776,904, 1988.
13. Hildenbrand, K.; von Döhren, H.H.; Perrey, H.; Wehling, K. U.S. Pat. No. 4,824,640, 1989.
14. Krause, C.; Werner, T.; Wolfbeis, O. *Anal. Sci.* **1998**, 14, 163.
15. Oehme, I.; Wolfbeis, O. *Mikrochim. Acta* **1997**, 126, 177.

16. Capitán-Vallvey, L.F.; Avidad Castañeda, R.; Fernández Ramos, M.D.; Alvarez de Cienfuegos, P.; Ariza Avidad, A. Oficina Española de Patentes y Marcas, Patent pending, No. P9900718, 1999.
17. Capitán-Vallvey, L.F.; Arroyo, E.; Berenguer, C.; Fernández Ramos, M.D.; Avidad Castañeda, R. *Fresenius J. Anal. Chem.* **2001**, *369*, 139.
18. Capitán-Vallvey, L.F.; Alvarez de Cienfuegos-Gálvez, P.; Fernández Ramos, M.D.; Avidad Castañeda, R. *Sens. Actuators B*, **2000**, *71*, 140.
19. Capitán Vallvey, L.F.; Avidad Castañeda, R.; Fernández Ramos, M.D.; Ariza Avidad, A. Oficina Española de Patentes y Marcas, Patent pending, No. P200002623, 2000.
20. Capitán-Vallvey, L.F.; Al-Barbarawi, O.; Fernández Ramos, M.D.; Avidad Castañeda, R.; Ramírez González, V. *Analyst* **2000**, *125*, 2000.
21. Capitán-Vallvey, L.F.; Fernández Ramos, M.D.; Avidad Castañeda, R.; Deheidell, M.K.A. *Anal. Chim. Acta* **2001**, *40*, 131.
22. Goth, A. *Farmacología Médica*, Doyma, Barcelona, 1984, p. 685.
23. Malçik, N.; Çağlar, P.; Narayanaswamy, R. *Quim. Anal.* **2000**, *19*, 94.
24. Oehme, I.; Prokes, B.; Murkovic, I.; Werner, T.; Klimant, I.; Wolfbeis, O. *Fresenius J. Anal. Chem.* **1994**, *350*, 563.
25. Marczenko, Z. *Separation and Spectrophotometric Determination of Elements*. Ellis Horwood Pub., 1986, pp. 262.
26. Saito, T. *Talanta* **1994**, *41*, 811.
27. Fohrster, J.W.; Ewing, K.; Ervin, A.; Lamontagne, L. WIPO PCT Patent No. WO 99/47917, 1999.
28. Ervin, A.M.; Ewing, K.J.; Nau, G.; Rowley, D.A.; Lamontagne, R.A.; Aggarwal, I.D. *Sens. Actuators B* **1998**, *53*, 104.
29. Seiler, K.; Simon, W. *Anal. Chim. Acta* **1992**, *266*, 73.
30. Banick, W.M.; Smith, G.F. *Anal. Chim. Acta* **1957**, *16*, 464.
31. Cornelis, R. *Ann. Clin. Lab. Sci.* **1996**, *26*, 252.
32. Cheney, W.; Kincaid, D. *Numerical Mathematics and Computing*, Book/Cole, 1980, 100.
33. Isaacson, E.; Keller, H.B. *Analysis of Numerical Methods*. John Wiley & Sons, 1966; 295.
34. Analytical Methods Committee. *Analyst* **1994**, *119*, 2363.
35. Analytical Methods Committee. *Analyst* **1988**, *113*, 1469.
36. Guidelines for data acquisition. *Anal. Chem.* **1980**, *52*, 2242.
37. Nomenclature, Symbols, Units and Their Usage in Spectrochemical Analysis. *Spectrochim. Acta (B)* **1978**, *33B*, 242.
38. Henry, J.B., Ed., *Chemical Diagnostics Management by Laboratory Methods*, 19 Edn.; Sanders, 1996.

39. Cornelis, R.; Heinzow, B.; Herber, F.M.R.; Molin Christensen, J.; Poulsen, O.M.; Sabbioni, E.; Templeton, D.M.; Thomassen, Y.; Vahter, M.; Vesterberg, O. *Pure Appl.Chem.* **1995**, *67*, 1575.

Received October 8, 2001

Accepted November 30, 2001

FLUORESCENCE RESONANCE ENERGY TRANSFER DISPOSABLE SENSOR FOR COPPER (II)

*L.F. Capitán-Vallvey**, *C. Cano-Raya* and *M.D. Fernández-Ramos*

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, Campus Fuentenueva,
University of Granada, Granada 18071 (Spain).

Abstract

A disposable sensor has been developed for the measurement of the copper (II) concentration in aqueous solution based on the change of fluorescence of the porphyrine 2,7,12,17-tetra-tert-butyl-5,10,15,20-tetraaza-21H,23H-porphine (TP). The sensor was constructed by spin-coating a polyester support with a PVC solution containing TP, a plasticizer, the chelating agent Zincon and the ion-pairing benzetonium chloride. The measurement principle is based on the radiationless resonance energy transfer (RET) from TP immobilized in membrane, and acting as fluorescence donor, to Zincon acting as an acceptor induced by copper (II). The absorption spectrum of Zincon – Cu(II) complex present adequate overlapping with emission spectrum of TP giving rise to useful analytical signal by RET process.

The disposable sensor responds to copper (II) irreversibly over a dynamic range from 0.039 to 14 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (2.5 – 890 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) with a sensor-to-sensor reproducibility (relative standard deviation RSD) of 1.9 %, as $\log a_{\text{Cu}^{2+}}$, at the medium level of the range and a response time of 10 min. The performance of the optical disposable sensor was tested for the analysis of copper in different types of natural waters (river, well, spring and swimming pool), validating results against a reference procedure.

Key words. Disposable sensor; Copper determination; Resonance energy transfer; Fluorescence; Water analysis.

* To whom correspondence should be addressed: (e-mail) lcapitan@ugr.es; (phone) +34 958248436; (fax) +34 958243328

Introduction

The determination of traces of metal ions has long been an important subject in environmental analysis and in many types of industrial processes and chemical reactions. Traditional optical techniques for metals ion assay in solution include inductively coupled mass spectroscopy and atomic/molecular absorption spectroscopy. Although there are extremely sensitive down to the subnanomolar level, all of these techniques are usually laboratory based, difficult to use in the field and not amenable to in-situ analysis. Additionally, if we consider that, in practice, there is a large number of water samples analyzed in routine analysis not contaminated by transition metals, the use of simple and cheap screening systems for selection of samples is interesting.

One of the solutions are the disposable sensors ideally considered as miniaturized self-contained analytical devices that respond to the presence or concentration of an analyte or analytes, usually through a chemical or biochemical reaction. The reagents needed to trigger the reactions and processes that lead to the answer are incorporated in the element itself, usually in a dry format, in a form that makes it unnecessary to prepare, dispense or mix the needed reagents, or perform operations like reaction, extraction, precipitation, dialysis, etc. Different one-shot or disposable sensors have been devised for metal ion especially in environmental analysis, based mainly in visual, optical or electrical properties through a great variety of sensing schemes [2]; [1]; [3]. Main problems observed are related with sensitivity, since the needed requirement are frequently under the detection limit of the most of commercial disposable sensors, with selectivity not enough to discriminate between different metal ions and low accuracy that sometimes produce semiquantitative conclusions.

The design of disposable sensors faces a key problem related to the implementation of an efficient transduction mechanism, which converts the binding of the analyte into a modification of the analytical property. Several mechanisms for optical signal transduction have been exploited and, among them, highlight the fluorescence resonance energy transfer (RET) that imply a fluorescence quenching via dipole-dipole resonance energy transfer [4]. The increase in selectivity arise from the resonance requirement of spectral overlap between donor emission and acceptor absorption for RET to occur [5].

Förster type energy transfer have been used for construction of optical sensors for different species such as elements thus iodine [6], anions thus chloride [7] or fluoride [8],

organic compounds thus picric acid [9] or gases as CO₂ [10] or NH₃ [11] and also for immunogenic analytes and haptens [12] or analytes with DNA affinities [13].

Different sensing schemes RET based have been proposed for metal ions, both using intensity measurements [14] or lifetime measurements [15]: i) The simplest scheme refer to the use of aquo complexes of transition metal ions that give d-d state absorptions in the ultraviolet, visible and near IR being able to act as acceptors from different selected donors embedded in perfluorocarbon Nafion films, such as Co(II) sensing using perylene [15], Cu(II) with Lumogen Orange [5] or Cu(II) with Rhodamine 800 [17]; [16]; ii) Conventional chromogenic reagents for metal ions have been used as acceptor for metal ions sensing in relationship with fluorescent dyes used as donors, thus Cu(II) sensing with the couple N,N,N',N'-tetra-methylethylene diamine - Texas Red X (donor) [17] or Cu(I) with bathocuproine – perylene (donor) [18]; alternatively, phosphorescent complexes could be used as a donor, thus the Al-Ferron chelate in connexion with di-thizone as acceptor used as screening for transition metal ions [19]; iii) metal ion recognition with an ionophore coupled with an indicator reaction, which include a chromoionophore as acceptor and a luminophore as donor, this is the case of a plasticized PVC membrane for potassium containing valinomycin and the ruthenium(II) tris-4,4'-diphenyl-2,2'-bipyridyl bromothymol blue ion pair [20]; iv) recognition employing an fluorescent-labeled apoenzyme, such carbonic anhydrase for Co(II) and Cu(II), and the d-d absorbance bands of metal ion [21]; v) induction of conformational changes by metal ions, such α -helical coiled coil polypeptides with both histidine residues as a metal binding site for Ni(II) and energy donor/acceptor residues [14]; vi) sensing by intramolecular RET amplification, that combine in the same molecule an analyte dependent fluorescent donor connected with an overlapped fluorescent acceptor. This is the case of a simple supramolecular system consisting of a triazole derivative, with high affinity to Al(III), connected via an ethylene spacer with a coumarin 343 [22] or the sodium sensing using a calix[4]arene having pyrene (as a donor) and anthroyloxy (as an acceptor) moieties [23].

The use of RET transduction in disposable sensors can provide a way to increase its sensitivity and selectivity over the use of conventional reagents, not supposing a problem the irreversibility of some of such reactions and offering a simple evaluation system, especially when measuring fluorescence intensity.

The development of a highly sensitive and selective optical disposable sensor procedure for Cu (II) based on RET transfer in plasticized PVC membrane between the Cu(II)

complex of the chromogenic reagent, Zincon, and a porphyrazine fluorescent donor, 2,7,12,17-tetra-tert-butyl-5,10,15,20-tetraaza-21H,23H-porphine, with enhanced analytical characteristics over conventional test strips, usually in the range of $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, is described in this paper.

Experimental

Apparatus and Software

Steady-state measurements were performed using a Hewlett Packard diode array spectrophotometer (model 8453; Nortwalk, CT, US) interfaced to a Pentium MMX 200 microcomputer via a HP IB interface board for absorption measurement and a Cary Eclipse fluorescence spectrometer (Varian Australia Pty Ltd.) interfaced to a Pentium 4 2.40 GHz via an IEEE-488 (GPIB) for fluorescence measurements. Fluorescence decay measurements were obtained using the time correlated single photon counting techniques with an OB 920 Spectrometer with a nF 900-HP nanosecond flash lamp and S900 single photon photomultiplier detection system (Edinburgh Instruments Ltd, Livingston, UK) interfaced to a AMD Athlon™ XP 2400+ 2.00 GHz via an EAI TCC/PCS card. As software for the acquisition and manipulation of the lifetimes data, the F900 single photon fluorescence spectrometer software package supplied by Edinburgh Instruments was used.

To obtain the absorbance and luminescence measurements of disposable sensors two types of homemade cell holders constructed in a wide black painted iron block, and with appropriate size for each type of spectrophotometer were used. For absorption measurements the holder have a 5 mm central hole for beam passing and a perpendicular 1 mm wide space for the introduction of the disposable sensor [24]. In the case of luminescence the measurements were made by transmission and the holder have two 5mm orthogonal holes and a 1 mm diagonal wide space in such a way that both excitation and emission beams form angles of 45° with the plane of the sensor [25].

The quantum yield was obtained using Cary 50 Bio UV-Vis spectrometer (Varian Australia Pty Ltd.), Lambda UV P14 spectrometer (Perkin Elmer Ltd., Beaconsfield, Buckinghamshire, UK) and an Aminco-Bowman Series 2 Luminescence spectrometer (SLM-Aminco, Rochester, NY, US) equipped with a continuous wave 150-w xenon lamp as a light source.

The pH values of the solutions were measured using a digital pH meter (Crison Instruments, Barcelona, Spain) calibrated at $20\pm 2^\circ\text{C}$ with standard buffers of pH 7.00 and

4.00 (Merck). The disposable sensors were prepared with a laboratory-made spin-on device [26].

Software programs used for the treatment of the data were: Statgraphics software package (Manugistics Inc. and Statistical Graphics Corporation, USA, 1992), ver.6.0 STSC Inc. Statistical Graphics Corporations, USA, 1993; Graphmatica for Win 32 ver. 1:60d, 1998 edited by K. Hertzner and adapted by J. Garrido and PhotochemCAD HD1.1 developed by H. Du, R.A. Fuh and J.S. Lindsey, 1998.

Reagents and materials

The chemicals used were of analytical-reagent grade and all aqueous solutions were prepared using reverse-osmosis type quality water produced by a Milli-RO 12 plus Milli-Q purification system (Millipore, Bedford, MA).

Stock solutions ($1,000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) were prepared in water, with adequate amount of acid if necessary, from nitrate salts of copper, cadmium (Panreac, Barcelona, Spain), mercury (II) (Probus, Barcelona, Spain), nickel, lead, and aluminum (Merck, Darmstadt, Germany), from sulfate salts of zinc and manganese (Merck), and from chloride salts of iron (III), calcium (Panreac) and magnesium (Merck). The solutions were standardized titrimetrically or by using atomic absorption spectrometry. pH 7.0 buffer solution 2 M was prepared from ammonium chloride and ammonia (Panreac).

For preparing the copper sensitive films, high molecular weight poly (vinyl chloride) (PVC), 2, 7, 12, 17-tetra-tert-butyl-5, 10, 15, 20-tetraaza-21 H, 23 H porphine (TP), 2-carboxy-2'-hydroxy-5'-sulfoformazylbenzene (Zincon), tributylphosphate (TBP), tris(2-ethylhexyl)-phosphate (TEHP), dioctylphthalate (DOP), bis(2-ethylhexyl) sebacate (DOS), 2-nitrophenyl octyl ether (NPOE), tetrabutylammonium bromide (TBAB), tri-dodecylmethylammonium chloride (TDMAC), tetradecyltrimethylammonium bromide (TDTMAB), hexadecyltrimethylammonium bromide (HDTMAB), benzetonium chloride (BC) and tetrahydrofuran (THF) were purchased from Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, Spain). Sheets of Mylar-type polyester (Goodfellow, Cambridge, UK) were used as support.

Preparation of disposable membranes and measurement set-up.

The membranes were produced on a polyester substrate using a spin-coating technique. Mixtures for the preparation of copper-sensitive membranes were made from a batch of 30.0 mg (31.06 wt %) of PVC, 64.0 mg (66.26 wt %) of TBP, 0.50 mg (0.52 wt %) of

TP, 0.43 mg (0.45 wt %) of Zincon and 1.66 mg (1.72 wt %) of BC dissolved in 1 ml of freshly distilled THF. The disposable sensors were cast by placing 15 μL of the cocktail on a 14 mm x 40 mm x 0.5 mm dust-free thick polyester sheet using a homemade spin-coater [26] rotating at 180 rpm. After spinning for 30 seconds, the membrane was removed from the spin coater and dried in a dryer with saturated THF atmosphere for 3 min at room temperature and then stored in a dark place until use. The sensing area of the disposable sensor is a transparent and red-violet 12 mm diameter circular film with a calculated thickness of about 13 μm and a concentration of Zincon, TP and BC in a dry thin film of 9.63 $\text{mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$; 9.61 $\text{mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$ and 38.35 $\text{mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$, respectively.

The response of the disposable sensors was evaluated by placing 25 mL of test solution, containing between 0.039 and 14 μM (in concentration) of Cu(II) and 2.5 mL of pH 7.0 ammonium chloride/ammonia buffer solution 2 M next to the disposable sensor in a 30-mL amber-glass bottle provided with screw cap and stirred in a vibrating agitator for 10 min at 800 oscillations per minute. Next, the membrane was pulled out from the solution, wiped to remove any solution droplets and its fluorescence was measured at $\lambda_{\text{exc}}=335$ nm and $\lambda_{\text{em}}=630$ nm using an excitation and emission slit widths of 5 nm. The Mylar support do not show fluorescence in the measurement conditions used, by which the blank sample was not subtracted in all cases. All measurements were carried out at room temperature (20 ± 3 °C). The membranes were not conditioned before its use.

Calculations.

The maximum fluorescence value, corresponding to the totally free complexing agent zincon (F_1) necessary for calculation of α values, were measured for each disposable sensor before use, while the minimum fluorescence value (F_0) corresponding to totally complexed Zincon by copper was obtained with a 10^{-4} M Cu(II) solution. Activities were calculated according to the two-parameter Debye-Hückel formalism [27]. The extraction constant K_e was calculated according to [28], using values in the maximum slope zone of the experimental response functions for copper, which provided less error. The quantum yield of porphyrazine TP in membrane (Φ_D) was estimated from eq. 1:

$$\Phi_D = \Phi_R \frac{A_R(\lambda_R)}{A_D(\lambda_D)} \cdot \frac{n_D^2}{n_R^2} \cdot \frac{D_D}{D_R} \quad (\text{eq. 1})$$

The quantum yield of reference (Φ_R) was that of the same compound in chloroform ($\Phi_R = 0.21$ [29]). $A_D(\lambda_D)$ is the absorbance of disposable sensor at the excitation wavelength

(335 nm), and $A_R(\lambda_R)$ is the absorbance of a solution of reference in such a way that give a similar absorbance to $A_D(\lambda_D)$. The refraction index of membrane (n_D) was calculated as the weighted average refraction index of the main components in the sensing zone (TBP and PVC), using a value of 1.46. As refraction index of the reference (n_R) that of Cl_3CH was used (1.44). The area under the corrected emission spectrum of membrane (D_D) or solution (D_R) were obtained in both cases exciting at 335 nm ($D_D=53.06$; $D_R=350.90$). The molar absorptivities of acceptor $\epsilon_A(\lambda)$ in membrane between 590 and 750 nm were calculated using the Beer' law for an optical path (membrane thickness) of 0.0013 cm and a Zincon concentration in membrane of 0.00967 mol/Kg, previous equilibration of membrane with an excess of Cu(II) ($1.0 \cdot 10^{-5}$ M).

Results and discussion

Sensing mechanism.

The sensing mechanism used in this disposable sensor relies on a extraction process between a bulk membrane of plasticized PVC and the aqueous problem containing the analyte [30]. In this mechanism the selective binding of copper by the reagent is transduced into a fluorescent signal through resonance energy transfer (RET) by a luminescent donor present in membrane.

Resonance energy transfer (RET) is a bimolecular fluorescence quenching process where the excited state energy of a donor fluorophore is non-radiatively transferred to a ground state acceptor molecule by a dipole–dipole coupling process [31]. This process suppose an additional channel of depopulation of the excited state of donor in addition to intrinsic fluorescence and non-radiative process and modify the decay law of donor fluorescence. An overlap of the donor emission spectrum with the absorption spectrum of acceptor is the required condition for RET and the transfer efficiency depend mainly on the extent of above spectral overlap and the distance between donor and acceptor according to the Förster theory [4].

The approach presented here for a copper disposable sensor requires the presence of two dyes homogeneously distributed in the membrane, one acting as the copper-sensitive reagent, that originate the acceptor species, the other as the analyte independent donor whose emission is modulated by the varying the amount of Cu(II). The requirements needed are the following: 1) a selective reagent (acceptor) for the analyte, copper in this case, although reversibility of reaction is no matter for a disposable sensor; 2) signifi-

cant modification of absorption spectrum of acceptor by reaction with copper; 3) significant overlapping of an absorption band of copper-acceptor species with an emission band of donor; 4) no significant overlapping of absorption band of reagent not reacted with analyte with emission band of donor; 5) the emission of donor must be independent of analyte concentration; 6) distance between donor and acceptor do not exceeding 100 Å; 7) high fluorescence quantum yield of donor; 8) solubility of donor and acceptor in hydrophobic membrane; 9) high lipophilicity of donor and acceptor in order to keep them in membrane.

We have selected as copper reagent Zincon (2-carboxy-2'-hydroxy-5'-sulfoformazylbenzene), an *O,N* donating chelating reagent used for the spectrophotometric determination of zinc and copper [33]; [32]; [34] that was preferred because of its bathochromic shift by complexation; good selectivity towards copper at near neutral pH, small pH dependence and possibility of its immobilization in membrane through its sulfonic group.

As acceptor we use a porphyrazine, that differ of porphyrins by the presence of four meso-nitrogen atoms as opposed to four methine groups in the central ring; compounds characterized by high symmetry, planarity, and electron delocalization. Namely, the porphyrazine selected was 2,7,12,17-tetra-tert-butyl-5,10,15,20-tetraaza-21 H,23 H porphyrin, that is not quenched by oxygen, do not react with copper and display appropriate emission spectrum and quantum yield (0.21 in Cl_3CH [29], 0.11 in benzene [35]).

The absorption spectrum of the PVC membrane containing only Zincon shows a broad maximum at 540 nm that shifts by complexation to 630 nm, in contrast with aqueous solution, at pH 6, that shows an absorption maximum at 465 nm that shifts to 600 nm by complexation with copper ($\epsilon = 1.9 \cdot 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) [34].

The absorption spectrum of selected porphyrazine exhibit a splitting of the Q-band due to the reduced D_{2h} symmetry, which removes the degeneracy of the lowest unoccupied molecular orbital (LUMO) [36], with main bands at 550 and 621 nm; and a B-band at 335 nm. The emission spectrum is composed of two bands at 630 nm, that obviously matches the absorption of Zincon-Cu(II) complex, and other small band at 690 nm [35] (Figure 1). When the disposable sensor is contacted with a copper solution, it is transported to membrane and complexed with Zincon, resulting in a decrease in the fluorescence emission band of porphyrin at 630 nm when excited at 335 nm.

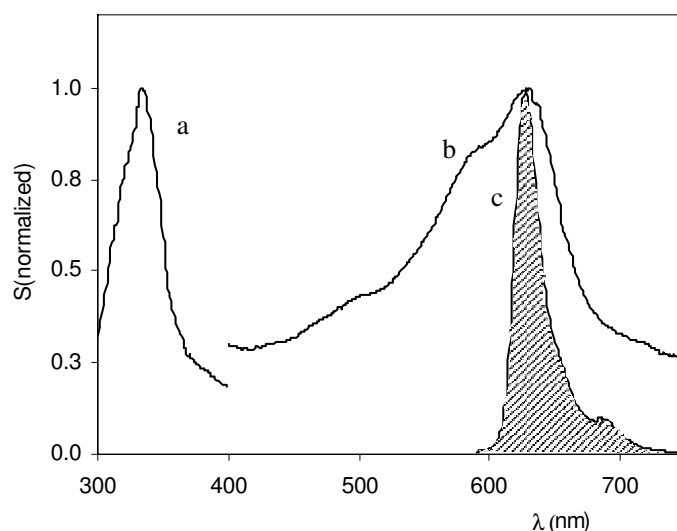


Figure 1. Normalized absorption spectra of the Zincon-Cu(II) complex (b) and TP (a) and normalized emission spectrum of TP (c) in plasticized PVC membrane.

In the presence of copper both intensity and lifetime of membrane fluorescence decreases indicating that Förster type energy transfer occurs. Thus, by introduction of a disposable membrane into a $1.0 \cdot 10^{-5}$ M Cu (II) solution at pH 7.0, the average lifetime decreased from 1.9 ns to 0.8 ns (Figure 2). The fluorescence lifetimes of disposable membrane before and after expose to above indicated copper solution fitted with a biexponential decay [before reaction: τ_1 1.2 ns (95%), τ_2 16.7 (5%), χ^2 1.264; after reaction: τ_1 0.4 ns (96%), τ_2 10.5 (4%), χ^2 1.189].

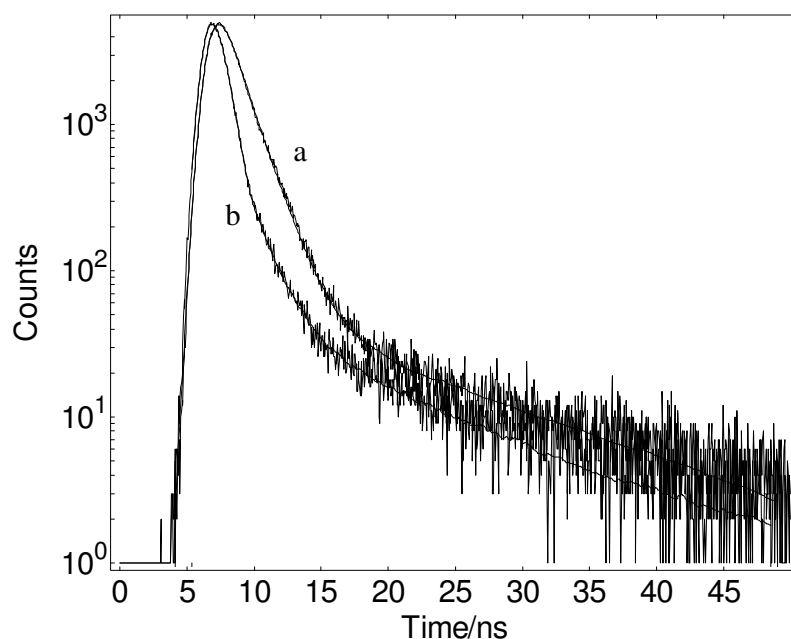


Figure 2. Decay profiles in absence (a) and in presence (b) of copper. $[Cu(II)] = 1.0 \cdot 10^{-5}$ M.

To characterize the RET process, the Förster distance was calculated from the spectral properties of the donor and the acceptor and the donor quantum yield using the Eq. 2:

$$R_0 = \frac{0.0211 \cdot \kappa^{1/3} \cdot \Phi_D^{1/6} \cdot J(\lambda)^{1/6}}{n^{2/3}} \quad (\text{eq. 2})$$

where κ is the orientation factor and we accept a $\sqrt{2/3}$ value supposing that donor and acceptor are free to rotate; Φ_D is the quantum yield of donor in membrane for which a value of 0.15 was obtained; and n is the refraction index of membrane (1.46) (see *Calculations* section). $J(\lambda)$, the overlap integral, indicate the spectral overlap between the donor emission and the acceptor absorption, according to eq. 3:

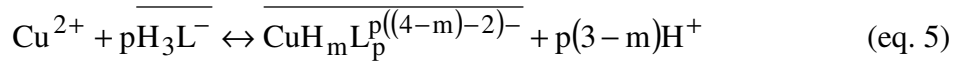
$$J(\lambda) = \frac{\int_{590\text{nm}}^{750\text{nm}} F_D(\lambda) \cdot \epsilon_A(\lambda) \cdot \lambda^4 \cdot d\lambda}{\int_{590\text{nm}}^{750\text{nm}} F_D(\lambda) \cdot d\lambda} \quad (\text{eq. 3})$$

$F_D(\lambda)$ is the corrected fluorescence intensity of the donor in the wavelength range of overlapping $\lambda + \Delta\lambda$ using the normalized to unity emission spectrum and $\epsilon_A(\lambda)$ is the molar absorptivity of acceptor at λ in membrane. Substituting in eq. 3 a $J(\lambda)$ value $5.76 \cdot 10^{15} \text{ nm}^4 \cdot \text{Kg} \cdot \text{moles}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ is obtained. The R_0 value, distance between a donor and acceptor pair at which RET is 50% efficient, obtained is 47.2 \AA that correspond to a critical transfer concentration of acceptor $[A]_{1/2}$ of $7.6 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ according to eq. 4 in which N is Avogadro's number.

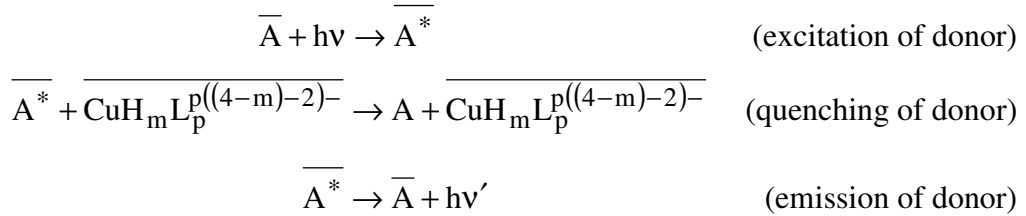
$$R_0 = \left(\frac{3000}{4\pi N [A]_{1/2}} \right)^{1/3} \quad (\text{eq. 4})$$

That correspond to the concentration of acceptor (Zincon-Cu(II) complex) needed as average to place an acceptor molecule within a distance R_0 of the donor. The Förster distance obtained here se encuentra entre the typical R_0 values (20-60 \AA). Those findings indicate that resonance energy transfer is the dominant mechanism for the interaction of Zincon-complex and TP in the membrane and that PVC is a suitable medium for the determination of Cu(II) in aqueous solution.

Assuming that Zincon ($R^+H_3L^-$) only reacts with copper ions in membrane, the following general extraction equilibrium holds:



in which barred species are in membrane phase, while all other chemicals are in aqueous solution. The lipophilic cation salt included into membrane in order to warrant electroneutrality, is not included in above equation. The photophysical process involved in the transduction of this disposable membrane can be described as follows:



The response characteristics description of the disposable sensor can be accomplished through the relative fluorescence intensity α that is defined as the ratio of free Zincon to the total amount of Zincon in the membrane phase (C_L), which lead to the following relationship between concentrations and fluorescent intensity of TP considering the RET process:

$$\alpha = \frac{[\text{H}_3\text{L}^-]}{C_L} = \frac{F - F_0}{F_1 - F_0} \quad (\text{eq. 6})$$

Here, F_0 and F_1 are the limiting fluorescence intensity of TP for $\alpha = 0$ (fully complexation of Cu(II) with Zincon and maximum RET from TP) and $\alpha = 1$ (in the absence of Cu(II) and so no RET process), respectively.

The α value is related to the extraction constant K_e , the analytical concentrations of ligand C_L and the activities of copper and protons in the aqueous sample through the response function:

$$\frac{\alpha^p}{1 - \alpha} = \frac{a_{\text{H}^+}^{p(3-m)}}{p \cdot K_e \cdot C_L^{p-1} \cdot a_{\text{Cu}^{2+}}} \quad (\text{eq. 7})$$

By adjusting the pH with an appropriate buffer it is possible to determine copper activity in solution fluorimetrically.

Optimisation of sensor response.

The factors that influence the disposable sensor response can be bunch in two groups: 1) related to the composition of the membrane (proportions of the cocktail components, and conditions used for membrane making), and 2) related to the reaction process be-

tween the sample solution and the disposable sensor (pH, time of contact and analyte activity).

Membrane composition. The porphyrazine TP used as a donor is readily soluble in THF and in the membrane polymer PVC, but it is not the case of charged reagents as Zincon, usually found as sodium salt. The immobilization of Zincon in PVC membrane is achieved via an ion pair with a lipophilic counter ion [37], although it is not necessary to synthesize the ion pair but to add the lipophilic salt to the cocktail, because is enough to favour Zincon solution, an additional role of lipophilic salt is to maintain the charged Zincon-Cu(II) complex in membrane as show eq. 5. To select the lipophilic salt we prepare a set of disposable sensors with different quaternary amines, namely: tetrabutylammonium bromide (TBAB), tridodecylmethylammonium chloride (TDMAC), tetradecyltrimethylammonium bromide (TDTMAB), hexadecyltrimethylammonium bromide (HDTMAB) and benzetonium chloride (BC). When reacted with $1.0 \cdot 10^{-5}$ M Cu(II) solution at pH 7.0, membranes containing TBAB or TDTMAB drain off the blue Zincon-Cu(II) complex; membranes with HDTMAB do not leach the complex but the color is faint and reach equilibrium slowly (30 min); finally, with the more lipophilic salts TDMAC or BC, a significant analytical signal was obtained in 10 min without leaching. The response was very similar using both salt, but BC was selected to form the ion pair with Zincon because the sensing area of membranes were more homogeneous than those obtained with TDMAC.

The influence of Zincon:BC ratio in membrane was studied using different cocktails, namely 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, and 1:10 ratio, observing that 1:1 and 1:2 ratio result in leaching of the blue complex and with the rest a similar decrease of some 70% in fluorescence was observed. A 1:4 ratio was selected as the lowest ratio that allow an easy solubilization of Zincon. Results indicate the needed deprotonation of reagent to react with Cu(II) what originate a complex with negative charge.

Different amounts of TP donor in membrane were tested ranging 0.3 to 0.7 %. Results (Figure 3) show that analytical signal is nearly constant up to 0.5 %, being this amount selected because higher amounts cause concentration quenching.

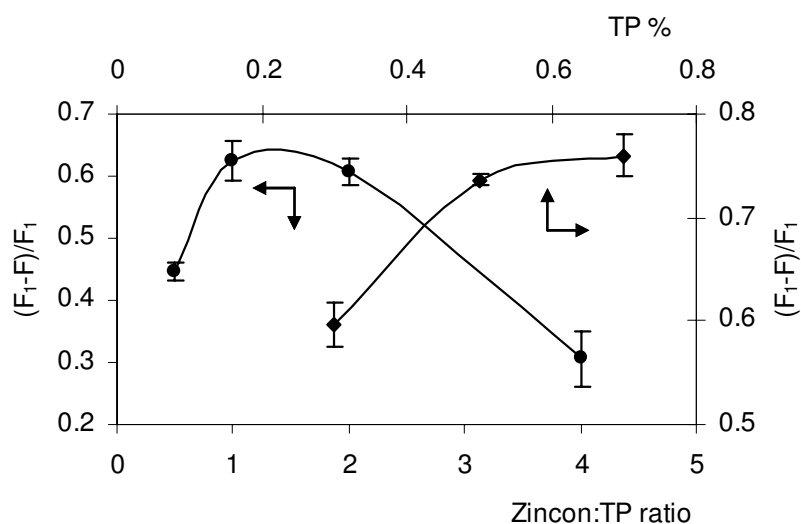


Figure 3. Influence of TP percentage and Zincon:TP ratio on the membrane composition.

When membranes with different Zincon:TP ratio (0.5:1; 1:1; 2:1 and 4:1) were exposed to Cu(II), signals are similar to 1:1 and 2:1 ratio disposable sensors (Figure 3), but the initial fluorescence decrease when this ratio increase according to 1:0.65:0.46:0.21 sequence due to absorption of radiation by free Zincon. So, an 1:1 ratio was selected because its higher initial fluorescence value and its analytical signal.

To select the plasticizer we conduct a preliminary study with different plasticizers (TBP, TEHP, NPOE, DOS, DOP) monitoring response signal over $1.0 \cdot 10^{-5}$ M Cu(II) and response time. DOP and DOS do not give any response; TEHP give more response (10%) but very slowly; TBP (100%) and NPOE (84%) give high signals with less response time. TBP was thus used as plasticizer for all subsequent experiments.

To optimize the percentage of plasticizer in the membrane, the response time and physical properties of the disposable membranes were studied. The response time to reach the equilibrium ($t_{95\%}$) of different membranes placed on the diagonal of a 10 mm path-length optical cell filled with a $1.0 \cdot 10^{-5}$ M copper solution, were: 26 min for 50% TBP; 14 min for 60%, 13 min for 66 %, 17 for 70 % and 18 min for 80%. With amounts higher than 70%, the physical properties worsening because the membrane is less homogeneous and the drying time increases. A 66% of TBP was chosen as a compromise value.

The membranes were prepared by spreading of the cocktails on a inert support of Mylar type generating in this way membranes with good mechanical and optical properties. The minimum volume would be that which is adequate to obtain a diameter and thick-

ness of the sensor zone which ensures that the diameter of the circular film formed is slightly lower than the width of the sheet of polyester, and higher than the width of the radiation beam of the spectrophotometer and where the fluorescence is not excessively high. Thus, 15 μL of cocktail was used for disposable membranes preparation. The reproducibility of membrane preparation calculated from the initial fluorescence that show is 3% (n=45).

Reaction conditions. Factors related with the reaction process are pH, ionic strength, reaction time, volume of the sample and copper concentration. The pH of sample do not affect the fluorescence of donor TP and modify in some extension the absorption of Zincon due to its acid-base equilibria in membrane (Figure 4). Zincon is in membrane as a 1:1 ion pair with the quaternary ammonium benzetonium [38] and when contact with aqueous solution of increasing pH increases its absorbance at 540 nm probably due to dissociation of carboxyl hydrogen (H_2L^{2-}) up to a plateau between pH 6 and 9, decreasing then the absorbance from this pH due to the dissociation of phenolic hydrogen (HL^{3-}) that move the absorption maximum to 510 nm [39]. This results differs from previously reported by Oehme et al. [40] in a study of different immobilization methods of Zincon on the performance of copper(II)-sensitive membranes, which do not find dissociation in the pH range 2 to 12. The different behavior observed could be attributed to the excess of benzetonium chloride present in this membrane, while Oehme et al. use procedures that do not allow the presence in membrane of Zincon species highly dissociated, such physical entrapment of synthesized Zincon-tetraoctylammonium ion pair or Zincon without the sulfonic group, electrostatic immobilization of Zincon in an anion exchanger or covalent immobilization on cellulose.

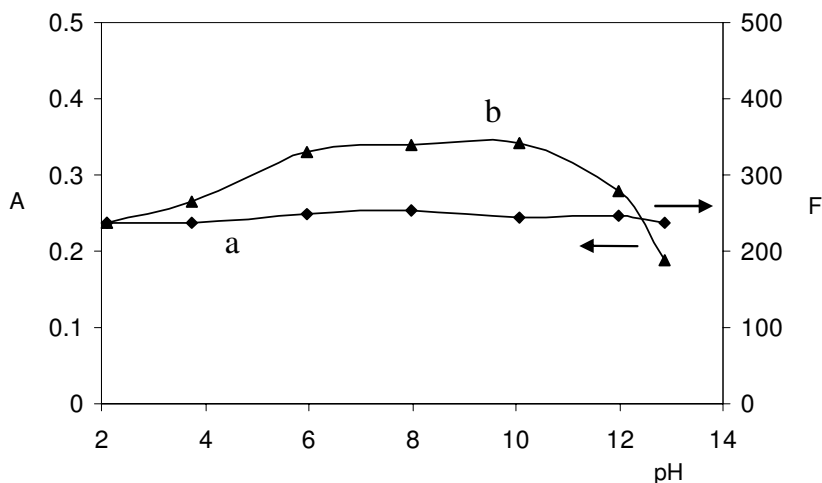


Figure 4. Influence of pH on membranes containing only TP (a) and on membranes containing only Zincon (b).

The reaction of disposable sensor with Cu(II) begin at pH 3 raising up to a plateau between 6 to 9 and decreasing at both sides. The fluorescence signal decreasing from pH 9 could be attributed to the formation of copper hydroxo complexes (Figure 5) similarly to found by Oehme et al. [37] in its study of a single shot test for Cu(II) based on Zincon in hydrogel membrane. The pH influence on zinc reaction was also studied, demonstrating that its reaction begin at pH 8 onwards, similarly to found in literature [37]; [41], reason by that a pH 7.0 was selected as working pH in order to avoid zinc interference. As a buffer pH 7.0 ammonium chloride/ammonia 0.2 M was selected.

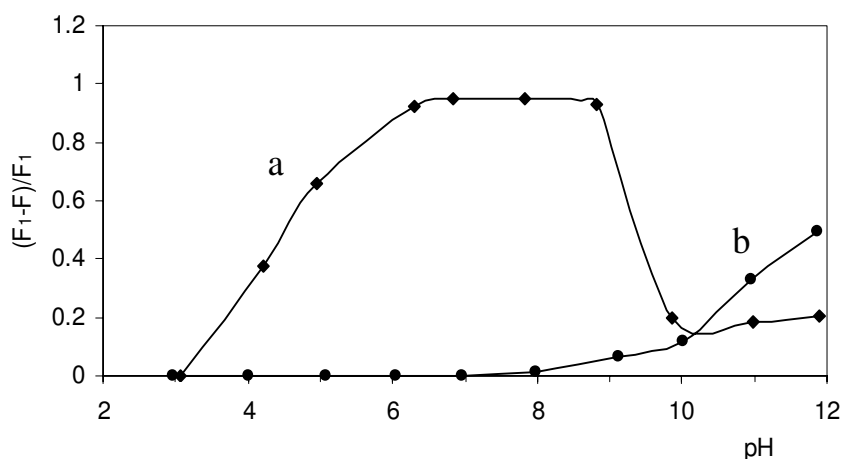


Figure 5. Effect of pH on sensor response: (a) $1.0 \cdot 10^{-5}$ M Cu(II); (b) $1.0 \cdot 10^{-5}$ M Zn(II).

The ionic strength affect very scarcely on the membrane response, thus when adjusted with NaCl up to 1.2 M, (the analytical signal decreases a 2% from 0.2 to 1.2 M). The influence of the volume of the sample was studied for volume values ranging from 10 to 100 mL (at $5 \cdot 10^{-6}$ M on copper). An increase of 30 % in the analytical signal was observed when the volume grows from 10 to 25 mL, while diminishes a 15% between 25 and 100 mL. Hence, 25 mL was selected as the working volume for the next experiments by its higher signal due to preconcentration and its better reproducibility (10 mL, 45% RSD; 25 mL, 1.6%; 50 mL, 4.5%; 100 mL 2.7%; n = 3 in all cases).

As the disposable sensor is irreversible due to the high stability of Zincon-Cu(II) complex ($\log K 7.5 \pm 0.1$ in water [33]), it is possible a copper preconcentration into the sensing zone by increasing not only the sample volume, but the contact time between the problem solution and the disposable sensor. We have observed, as in previous papers based on irreversible reactions [25]; [43]; [42], that the equilibration time necessary for the development of the analytical signal is variable depending on the concentration level of the analyte in the sample. Consequently, an increase in the reaction time would enable the detection of low copper concentrations. In order to generate a result within an adequate frame of time, it is necessary to agitate the solution with the membrane, in order to eliminate the diffusive convection, rate-limiting step of reaction. Two different methods of agitation were tried (magnetic stirrer and vibrating agitator) showing that 10 min is enough to obtain the maximum signal, but a more homogenous colour in the membrane were achieved with the use of a vibrating agitator operating at 800 oscillations a minute.

The response of the disposable sensor to copper activities between $9.3 \cdot 10^{-12}$ M and $9.2 \cdot 10^{-5}$ M in activities ($1.0 \cdot 10^{-11}$ M and $1.0 \cdot 10^{-4}$ M in concentrations) at pH 7.0 is shown in Figure 6 along with the theoretical response function using Eq. 7 for the stoichiometric ratio of Zincon/copper, $p = 1$ and 2. The change in stoichiometry modify the slope, being 1:1 stoichiometry in membrane that best fit experimental data.

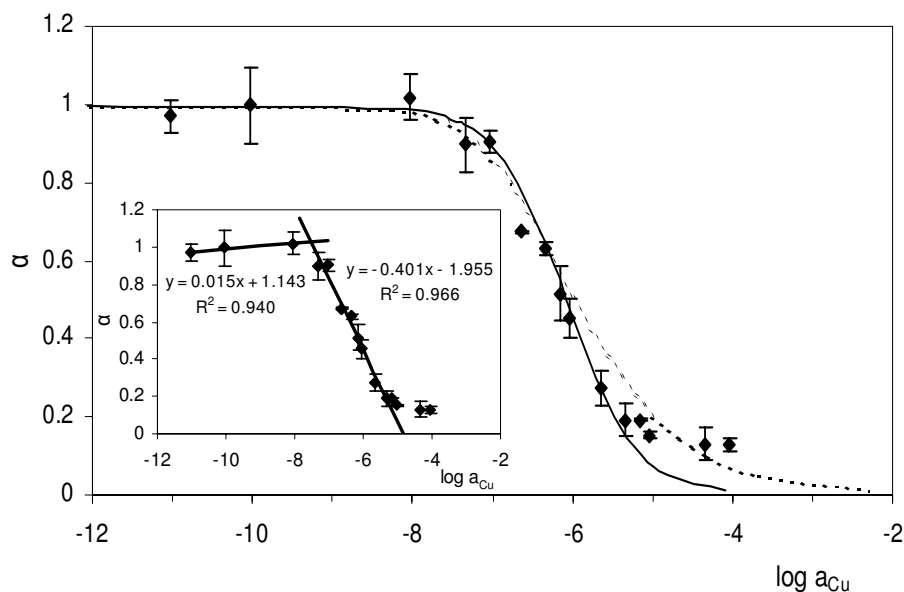


Figure 6. Response curve. Solid lines are theoretical curve for 1:1 stoichiometry (L:M) and dashed line for 2:1 stoichiometry. Inset: Calibration plot for free copper activity.

The stoichiometry observed in this case for the Zincon:copper complex agree with that described for the same complex in water [33]; [32]. Additionally the complex carry negative charge when formed in water as is demonstrated by ion-exchange experiments [41]; [44]; [33], what suppose that Zincon lose carboxylic and phenolic protons by complexation with copper following a complex with one negative charge. We suppose here the same behaviour in PVC membrane, that imply $m = 1$ in eq. 7, in agreement with results [40] reported for hydrogel and sol-gel membranes containing only Zincon without the sulfonic group that could retain Cu(II), which imply a neutral complex formation with the lose of two protons in membrane. The fit by least-squares of the experimental points, in the linear maximum slope zone (8 different concentration levels and 3 replicates of each one) of the response curve for copper to the theoretical model, makes it possible for us to calculate for $\log K_e$ the value 7.9 ± 0.1 . It was observed in the response function that at high copper concentrations the response moves away from that theoretically expected, since the α values, fraction of free Zincon, are higher than predicted by theory. This could be explained considering that at high Cu(II) concentration all Zincon will be complexed and the RET process must be maximum, however the Zincon:TP ratio is 1:1 and the transfer efficiency is not very high. Namely, assuming a single fixed distance between donor and acceptor a value of 0.58 could be estimated

from lifetimes. This supposes the existence of a background value of fluorescence and explain the high α value.

Analytical Parameters

To characterize the copper disposable sensor we used the linear relationship in the middle of the sigmoidal response function defined by means of a lack-of-fit test as the measuring range and the intersection of the linear calibration function and a linear function adjusted in the minimal slope zone as the detection limit [28]. To define the measuring range we used two series of standards; one in the maximum slope zone (8 standards, 3 replicates each one, each replicate being measured with a different strip), between $4.6 \cdot 10^{-8}$ and $4.6 \cdot 10^{-6}$ in activities ($5.0 \cdot 10^{-8}$ and $5.0 \cdot 10^{-6}$ M in concentration), and other in the minimum slope zone of lower activity (3 standards, 3 replicates each one, again each replicate being measured with a different strip), between $9.3 \cdot 10^{-12}$ and $9.3 \cdot 10^{-9}$ in activities ($1.0 \cdot 10^{-11}$ and $1.0 \cdot 10^{-8}$ M in concentration). The linearity of each of the two series was tested by applying a lack-of-fit test and the following linear functions were obtained: 1) maximum slope: $\alpha = -1.955 - 0.401 \log a_{\text{Cu}^{2+}}$; 2) minimum slope in the zone of lowest activity: $\alpha = 1.143 - 0.015 \log a_{\text{Cu}^{2+}}$. The interception of functions with maximum and minimum slopes in the zone of lower activity gave us a detection limit of $0.039 \mu\text{M}$ ($2.5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) (in concentration).

The upper limit of the measuring range was obtained from the intercept of the linear calibration function with the axis of abscise; the value obtained is $13 \mu\text{M}$. So, the measuring range for copper determination is between 0.036 and $13 \mu\text{M}$, expressed both in activities.

The precision using different disposable sensors, and expressed as relative standard deviation (RSD), was obtained at three activity levels of Cu(II), namely $0.093 \mu\text{M}$, $1.9 \mu\text{M}$ and $3.7 \mu\text{M}$ in activities (0.1 , 2.0 and $4.0 \mu\text{M}$ in concentrations) and $n=8$, and had values of 2.5 , 1.9 and 1.7% for $\log a_{\text{Cu}^{2+}}$. The disposable sensor cannot be reused due it works in a irreversible way. Its stability tested with a series of membranes checked during a time at a Cu(II) concentration in the middle of the range and protected from light and excessive humidity is at least one month. Table 1 shows these and other analytical parameters.

Table 1. Analytical Figures of Merit

Parameter	Value; S
Intercept	-1.955; 0.103
Slope	-0.401; 0.016
Probability level % (lack-of-fit test)	10.74
Detection limit	0.039 μM
Linear range	0.039 – 14 μM
RSD ^a	2.5 % (0.093 μM^{b})
	1.9 % (1.9 μM^{b})
	1.7 % (3.7 μM^{b})
Time of response	10 min
Stability	1 month
Cost	0.003 €/strip

a: RSD for $\log a_{\text{Cu}^{2+}}$; b: activity tested

The effect of different potential interferent species on the determination of Cu(II) were investigated at a 1 μM level. This study were performed at three concentration level of interferent: 1, 10 and 50 μM and in each case and each concentration six different membranes were prepared and reacted three of them with Cu(II) and the rest with the interferent tested, comparing statistically results (P-value). From the species studied (Zn(II), Ni(II), Fe(III), Cd(II), Hg(II), Mn(II), and Pb(II)) only Zn(II) give interference at 50-fold excess. Additionally, Ca(II) at a level of 3,000 μM , Mg(II) at 1,740 μM and a mixture of chloride, sulphate and nitrate at 1,000 μM each do not interfere. It is noticeable the non interference of chloride even at concentrations up to 1.2 M, that make the disposable sensor potentially useful in high salinity samples.

The analytical performance of the disposable sensor described here is better than that of others based in the same or others chromogenic reagents [2]. For instance, the plasticized hydrogel membrane for FIA spectrophotometric Cu(II) determination based on Zincon work between 1 and 100 μM [37]. Compared with RET procedures for Cu(II) described in literature, a detection limit of 12.9 μM is described for a procedure in solution based on Fluorescence Red, Eosin Y and 1,10 phenanthroline [45]. The use of sen-

sors membranes could improve the detection limit, thus through the sensing scheme proposed by Rolinski et al. based in Texas Red X and N,N,N',N'-tetra-methylethylene diamine in Nafion with a detection limit for Cu(II) of 0.031 μM [46] or based in batocuproine and perylene in Nafion or Amberlite resin for Cu(I) with a detection limit of 0.002 μM [18], although the analytical procedure is not developed for none of them.

Application of the method

The usefulness of the disposable sensor developed here for the determination of copper was checked against actual samples of waters of diverse provenance (spring, well, swimming pool, river and tap water from old copper pipelines). The test method was validated by comparison with a standard ASS used as a reference method and the results obtained by both methods were satisfactory (P-value) as shown in Table 2.

Table 2. Determination of copper in different types of water using ASS as a reference method

Matrix	Sensor method ($\mu\text{M Cu}$)	S	Reference method ($\mu\text{M Cu}$)	S	P _{val} (%)
Spring water (<i>La Peza, Granada</i>)	0.6	0.15	0.746	0.009	12.79
Tap water (<i>Ogijares, Granada</i>)	0.8	0.18	1.009	0.003	9.12
Tap water (<i>San José, Almería</i>)	0.8	0.10	0.913	0.003	19.45
Well water (<i>Otura, Granada</i>)	1.0	0.35	1.138	0.006	46.04
Well water (<i>La Línea, Cádiz</i>)	1.0	0.23	1.111	0.003	34.84
Swimming pool (<i>Peligros, Granada</i>)	0.6	0.14	0.72	0.010	12.06
River water (<i>Granada</i>)	2.0	0.17	1.938	0.003	59.11

Conclusion

An optical disposable sensor has been presented for the determination of copper (II) in neutral solution based on resonance energy transfer as recognition system. The sensing membrane are easily produced by immobilizing homogeneously in a plasticized PVC membrane the donor 2,7,12,17-tetra-tert-butyl-5,10,15,20-tetraaza-21H,23H-porphine and the conventional photometric reagent Zincon as an ion pair with benzenonium. By a right selection of copper (II) chromogenic reagent, fluorescence donor, membrane composition and reaction conditions we succeeded in preparing a very simple disposable optical sensor with higher sensitivity than other optode membranes for copper and high selectivity. The response time is not very high, being 10 min with agitation and 13 min without it, gendering an irreversible answer that could be evaluated by means a conventional fluorimeter. Only needing buffering, this sensor offers good results, with an accuracy, precision and cost that make it useful for routine analysis.

Acknowledgements

We acknowledge financial support from the *Ministerio de Educacion y Cultura, Dirección General de Enseñanza Superior* (Spain) (Project No. BQU2002-00353).

References

1. Yu. Zolotov, V.M. Ivanov, V.G. Amelin, *Chemical test methods of analysis*, Elsevier, Amsterdam, 2002.
2. I. Oehme, O.S. Wolfbeis, *Mikrochim.Acta* 126 (1997) 177.
3. L.F. Capitán-Vallvey, M.D. Fernández-Ramos, *Solid-phase spectrometric assays*, in S. Alegret, Ed. *Integrated Analytical Systems*, Elsevier Science B.V, Amsterdam, 2003, p. 81.
4. J.R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer, 1999.
5. A.S. Holmes, M. Lopez, O.J. Rolinski, D.J.S. Birch, M. Darbyshire, *SPIE* 2388 (1995) 171.
6. R.H. Yang, K.M. Wang, D. Xiao, X. Hai Yang, *Analyst* 125 (2000) 1441.
7. C. Huber, T. Werner, C. Krause, I. Klimant, O.S. Wolfbeis, *Anal.Chim.Acta* 364 (1998) 143.
8. R. Pohl, D. Aldakov, P. Kubat, K. Jursikova, M. Marquez, P. Anzenbacher, Jr., *Chem.Comm.* (2004) 1282.
9. R. Ni, R.B. Tong, C.C. Guo, G.L. Shen, R.Q. Yu, *Talanta* 63 (2004) 251.
10. Y. Amai, N. Nakamura, *Sensors Act.B* 100 (2004) 351.
11. Q. Chang, J. Sipior, J.R. Lakowicz, G. Rao, *Anal.Biochem.* 232 (1995) 92.
12. O.J. Rolinski, D.J.S. Birch, L. McCartney, J.C. Pickup, *Spectrochim.Acta A* 57A (2001) 2245.
13. A.S. Steven, *Curr.Op.Biotech.* 11 (2000) 47.
14. A. Kashiwada, Y. Nakamura, K. Matsuda, *Sensors Act.B*, in Press (2005).

15. D.J.S. Birch, A.S. Holmes, M. Darbyshire, *Meas.Sci.Technol.* 6 (1995) 243.
16. O.J. Rolinski, D.A. Hatrick, A. Volkmer, D.J.S. Birch, *J.Fluor.* 7 (1997) 207S.
17. O.J. Rolinski, I.R. Downie, A.S. Holmes, D.J.S. Birch, *Proc.SPIE* 2388 (1995) 290.
18. O.J. Rolinski, D.J.S. Birch, *Meas.Sci.Technol.* 10 (1999) 127.
19. J. Díaz-García, J.M. Costa-Fernández, N. Bordel, R. Pereiro-García, A. Sanz-Medel, *Anal.Chim.Acta* 486 (2003) 1.
20. C. Krause, T. Werner, C. Huber, I. Klimant, O.S. Wolfbeis, *Anal.Chem.* 70 (1998) 3983.
21. R.B. Thompson, Z. Ge, M. Patchan, C.C. Huang, C.A. Fierke, *Biosensors Bioelectron.* 11 (1996) 557.
22. M. Arduini, F. Felluga, F. Mancin, P. Rossi, P. Tecilla, U. Tonellato, N. Valentini, *Chem.Comm.* 2003 (2003) 1606.
23. T. Jin, *Chem.Comm.* (1999) 2491.
24. L.F. Capitán-Vallvey, P. Alvarez de Cienfuegos, M.D. Fernández-Ramos, R. Avidad-Castañeda, *Sensors Act.B* 71 (2000) 140.
25. L.F. Capitán-Vallvey, O.M.A. Al-Barbarawi, M.D. Fernández-Ramos, R. Avidad-Castañeda, V. Ramirez Gonzalez, *Analyst* 125 (2000) 2000.
26. K. Seiler, W. Simon, *Anal.Chim.Acta* 266 (1992) 73.
27. P.C. Meier, *Anal.Chim.Acta* 136 (1982) 363.
28. L.F. Capitán-Vallvey, M.D. Fernández-Ramos, P. Alvarez de Cienfuegos, *Anal.Chim.Acta* 451 (2002) 231.

29. H. Du, R.C.A. Fuh, J. Li, L.A. Corkan, J.S. Lindsey, *Photochem.Photobiol.* 68 (1998) 141.
30. E. Bakker, P. Bühlmann, E. Pretsch, *Chemical Rev.* 97 (1997) 3083.
31. T. Förster, *Ann.Chim.* 2 (1948) 55.
32. R.M. Rush, J.H. Yoe, *Anal.Chem.* 26 (1954) 1345.
33. M.A. Dosal Gomez, J.A. Perez-Bustamante, F. Burriel-Marti, *Anal.Quim.* 70 (1974) 515.
34. K.L. Cheng, K. Ueno, T. Imamura, *Handbook of Organic Analytical Reagents*, CRC Press, Boca Raton, Florida, US, 1982.
35. N. Kobayashi, S.i. Nakajima, H. Ogata, T. Fukuda, *Chem.Eur.J.* 10 (2004) 6294.
36. D. Pop, B. Winter, W. Freyer, I.V. Hertel, W. Widdra, *J.Phys.Chem.B* 107 (2003) 11643.
37. I. Oehme, B. Prokes, I. Murkovic, I. Werner, I. Klimant, O.S. Wolfbeis, *Fresenius J.Anal.Chem.* 350 (1994) 563.
38. A.K. Trofimchuk, Y. Tarasova, *J.Anal.Chem.* 59 (2004) 114.
39. F.S. Sadek, R.W. Schmid, C.N. Reilley, *Talanta* 2 (1959) 38.
40. I. Oehme, S. Prattes, O.S. Wolfbeis, G.J. Mohr, *Talanta* 47 (1998) 595.
41. R.M. Liu, D.J. Liu, A.L. Sun, *Talanta* 40 (1993) 381.
42. L.F. Capitán-Vallvey, E. Arroyo, C. Berenguer, M.D. Fernández-Ramos, R. Avidad-Castañeda, *Fresenius J.Anal.Chem.* 369 (2001) 144.

43. L.F. Capitán-Vallvey, M.D. Fernández-Ramos, R. Avidad-Castañeda, M. Deheid, *Anal.Chim.Acta* 440 (2001) 131.
44. P. Richter, M.I. Toral, H. Castro, *Anal.Lett.* 35 (2002) 635.
45. M. Hou, J. Zhang, *Fenxi Kexue Xuebao* 20 (2004) 619.
46. Rolinski, O. J.; Birch, D. J. S., (1997) .



Irreversible optical test strip for mercury determination based on neutral ionophore

L.F. Capitán-Vallvey*, C. Cano Raya, E. López López, M.D. Fernández Ramos

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

Received 11 December 2003; received in revised form 3 March 2004; accepted 23 March 2004

Available online 18 May 2004

Abstract

A test strip for the determination of mercury in aqueous solution has been developed. It has a circular sensing zone containing all the reagents necessary to produce a selective response to mercury and formed by plasticised PVC incorporating the cation-selective neutral ionophore 1,4,7,10-tetraazacyclododecane, the chromoionophore 9-dimethylamino-5-[4-(15-butyl-1,13-dioxo-2,14-dioxanonadecyl)phenylimino]benzo[a]phenoxazine and tetrabutylammonium tetraphenylborate as lipophilic salt. The measurement principle is based on an ion-exchange mechanism. When the sensor is introduced for a period of time depending on the mercury content into a water sample at a pH of 4.7, there is a colour change from blue to red, making it possible to use absorbance at 670 nm as the analytical signal. All experimental variables that influence the test strip response, especially in terms of selectivity and response time, were studied. The sensor responded linearly to mercury concentration in the range 0.3 and 5.1 μM with a reproducibility in mid-calibration of 1.6% relative standard deviation (R.S.D.) for 60 min agitation. Similarly, it responded linearly to concentrations in the range 7.9–108 μM with a mid-range R.S.D. of 1.8% (for 5 min without agitation). The procedure was applied to the determination of mercury in different types of waters (tap, mineral and spring), validating the results against a reference procedure.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Mercury determination; Optical test strip; Neutral ionophore; Water analysis

1. Introduction

The determination of trace amounts of heavy metal ions is of interest in several fields including environmental analysis, process control, biology, and medicine. Mercury is a particularly toxic element of great environmental concern because it is widespread in the lithosphere and in water [1,2]. Over recent decades, considerable progress has been made in analytical methodology for mercury detection, including atomic absorption or emission spectrometry, mass spectrometry and voltammetry. For analysis of trace levels of different mercury species, the most widely used approaches are chromatographic methods with spectrometric detectors [3,4]. Although these methods are sensitive and accurate, most require a tedious sample pre-treatment, sophisticated performance and/or expensive equipment, and none of the methods can be used for field screening or on-site assay.

Currently, there is a particular need for simple and fast field analytical tests. Among these tests, the dry reagent test strip method is one of the one-step analytical methods that has been widely used in clinical analysis [5–7]. Test strips can be described as integral analytical elements typically in the form of thin pads or films which contain all of the reagents required for an assay distributed in a dry form within the pad or film [8] and with the reaction zone fastened to the lower region of small plastic bars. To use these systems, a drop or precise volume of a fluid problem is placed on one of the surfaces of the solid phase element by dipping or addition, from where it diffuses into the reaction zone. After the reaction, an optical property (absorbance [9], diffuse reflectance [10], luminescence [11]) or electrochemical [12] property of the generated derivative is measured on the device itself.

Different strategies have been used to develop optical or visual test strips for mercury. Examples include enzymatic inhibition, based on urease inhibition and measurement of the elapsed time until the disappearance of the pH indicator colour used for mercury in waters with a detection limit

* Corresponding author. Tel.: +34-958-243326; fax: +34-958-243328.
E-mail address: lcapitan@ugr.es (L.F. Capitán-Vallvey).

of 0.2 ng ml^{-1} [13] and conventional reagents such as tyrodine, a rhodanine analogue, retained in membranes of polycapromide, used for mercury in industrial samples with detection limits lower than 5 ng ml^{-1} [14].

The test strip developed here relies on the ionophore-based chemistries that are frequently used in the test strip field for the rapid detection of ions, mainly alkaline and alkaline earth ions in clinical samples. The most common method is based on an ion exchange between a hydrophobic phase containing a neutral ionophore, usually coronands, cryptands or podands, capable of binding the metal ion from an aqueous solution, and a proton-selective chromoionophore that changes its colour or fluorescence by releasing protons when the metal ion is taken and is proportional to its concentration [15].

This type of test strip has been implemented in two formats: mono- and multi-layer. The mono-layer formats can be classified into homogenous [16,17] and heterogeneous membranes. In the latter case, the membrane is compartmentalised to separate the particular sequential steps of the overall analytical reaction, with the main goal being to shorten the reaction time. There are various approaches: (a) impregnated solid particles [18–20]; (b) the use of a porous carrier matrix impregnated with an hydrophobic phase containing the plasticiser, ionophore and chromoionophore [21,22]; (c) the use of emulsions in both phases where hydrophilic polymers containing a buffer are distributed in a hydrophobic film-forming polymer containing the reagents [23].

In this paper, we propose a new optical test strip to determine mercury based on a homogenous membrane that contains the chemicals for the reaction needed to selectively and quantitatively respond to mercury by modifying the colour. The test strip proposed here for mercury is based on the use of an ionophore and chromoionophore and works by an ion-exchange mechanism, in an irreversible way. We have studied different ionophores, selecting 1,4,7,10-tetraazacyclododecane because it is selective enough for its intended application, the determination of mercury in waters.

2. Experimental

2.1. Apparatus and software

A Hewlett-Packard HP-8453 diode array spectrophotometer (Nortwalk, CT) interfaced to a Pentium MMX 200 microcomputer via a HP IB interface board and HP IB cable for spectral acquisition and subsequent manipulation of data was used to perform the absorbance measurements. As software for the acquisition and manipulation of the spectral data, the UV-Vis Chemstation software package supplied by HP was used. To obtain the absorbance measurements, a 44 mm high, 12 mm² base homemade cell holder constructed in a wide black painted iron block was used. The diameter

of the central hole of the cell holder was 5 mm and it was placed 11.5 mm from the base. The cell holder contained a 1 mm wide space for the introduction of the strip [24].

Other apparatus and laboratory materials were: a laboratory-made spin-on device [25], a 50 μl micropipette by Brand GmbH (Wertheim/Main, Germany), a digital pH meter with a combined glass-saturated calomel electrode (Crison Instruments, Barcelona, Spain), an ultrasonic bath (Selecta, Ultrasons, Barcelona) and a vibrating agitator Vibromatic-384 (Selecta).

Software programs used for the treatment of the data were: Statgraphics software package (Manugistics Inc. and Statistical Graphics Corporation, 1992), Version 6.0 STSC Inc. Statistical Graphics Corporation, 1993 and Graphmatica for Windows 32, Version 1:60d, 1998 edited by K. Hertzner and adapted by J. Garrido.

2.2. Reagents and materials

Mercury stock solution ($1 \times 10^{-4} \text{ M}$) was prepared in pH 4.7 acetic acid/potassium acetate 0.01 M buffer by exact weighing of mercury nitrate monohydrate (Probus, Barcelona). Solutions of lower concentration were prepared by dilution with the same buffer solution. The stock solutions of the following ions were also used: 0.1 M Pb(II) as nitrate (Probus), $5 \times 10^{-3} \text{ M}$ Fe(III) as the chloride hexahydrate (Panreac), 0.1 M Ni(II) as nitrate hexahydrate (Merck, Darmstadt, Germany), 0.1 M K as its nitrate (Panreac), 0.1 M Mg(II) as the chloride hexahydrate (Merck), 0.1 M Ca(II) as the chloride dihydrate, 0.1 M Na as its chloride, 0.01 M Cu(II) as nitrate trihydrate, 0.1 M Cd(II) as its nitrate tetrahydrate and 0.1 M Zn(II) as its sulfate monohydrate (all from Panreac). All the solutions were prepared in pH 4.7 acetic acid/potassium acetate 0.01 M buffer, prepared from acetic acid and KOH (both from Panreac).

For preparing the sensing films, poly(vinyl chloride) (PVC; high molecular weight), tributylphosphate (TBP), 2-nitrophenyloctylether (NPOE), bis(2-ethylhexyl)sebacate (DOS), dioctylphthalate (DOP), *tris*(2-ethylhexyl)phosphate (TEHP) and tetrahydrofuran (THF) were purchased from Sigma (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid) and 1,4,7,10,13,16-hexathiacyclooctadecane, 1,4,7,10,13,16-hexaazacyclooctadecane, 1,4,8,12-tetraazacyclopentadecane, 1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane, 1,4,7,10-tetraazacyclododecane, 1,4,7-triazacyclononane, 1,4,7-trithiacyclodecane, 9-dimethylamino-5-[4-(15-butyl-1,13-dioxo-2,14-dioxanon-9-acyl)phenylimino]benzo[a]phenoxazine, tetrabutylammonium tetraphenylborate, potassium tetrakis(4-chlorophenyl)borate, tetraheptylammonium tetraphenylborate, and tetradodecylammonium tetrakis(4-chlorophenyl)borate were purchased from Fluka (Madrid). Sheets of polyester type Mylar (Goodfellow, Cambridge, UK) were used as support. All chemicals used were of analytical-reagent grade and reverse-osmosis type quality water (Milli-RO 12 plus Milli-Q station from Millipore Corp.) was used throughout.

2.2.1. Test strip preparation

Mixtures containing 26.0 mg (28.4 wt.%) of PVC, 64.1 mg (70.0 wt.%) of TBP, 0.12 mg (0.13 wt.%) of 1,4,7,10-tetraazacyclododecane, 1 mg (1.09 wt.%) of 9-dimethylamino-5-[4-(15-butyl-1,13-dioxo-2,14-dioxanonadecyl)phenylimino]benzo[a]phenoxazine and 0.39 mg (0.43 wt.%) of tetrabutylammonium tetraphenylborate were used for the preparation of mercury-sensitive membranes. The membrane components were dissolved in 1 ml of freshly distilled THF. Using a homemade spin-on device, the single-use membranes were cast by placing 15 μ l of the mixture on a 14 mm \times 40 mm \times 0.5 mm thick polyester sheet. The 30 s after deposition, the rotation was stopped and the membrane was left in a dryer with a saturated THF atmosphere for 3 min at room temperature to enable a slow evaporation of the solvent. The prepared sensing membrane was a solid and homogeneous 6 mm diameter circular film, with a calculated thickness of about 12 μ m, transparent and red in colour, well-adhered to the solid support and containing 7.60 mmol kg⁻¹ ionophore, 15.16 mmol kg⁻¹ chromoionophore and 7.58 mmol kg⁻¹ of anionic sites.

2.2.2. Absorbance measurements

The analytical parameter used was the absorbance of the sensing zone of the test strip measured at 670 nm against a Mylar polyester sheet. The absorbance measurements were obtained with the use of the cell holder described above, which improved the reproducibility between membranes by measuring the absorbance in a zone 5 mm in diameter, which was less than the diameter of the sensing zone of the test strip.

2.2.3. Procedure for samples and standards

2.2.3.1. Five minute procedure. An aliquot of aqueous standard solution (10 ml) containing 7.9–107.8 μ M Hg(II) was placed in a 10 cm \times 1.5 cm polyethylene plastic and a prepared test strip was introduced into the tube for 5 min without agitation. Next, the membrane was pulled out of the solution, wiped to remove any solution droplets and its absorbance measured as described in Section 2.2.2.

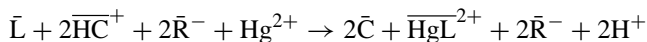
2.2.3.2. Sixty minute procedure. An aliquot of aqueous standard solution (10 ml) containing 0.3–5.1 μ M Hg(II) was placed in a 10 cm \times 1.5 cm polyethylene plastic and a prepared test strip was introduced into the tube and stirred in a vibrating agitator for 60 min at 600 oscillations min⁻¹. The operation was then continued as above.

All measurements were carried out at room temperature. The membranes were not conditioned before use.

In the case of the water samples, 1 ml of water was introduced in a polyethylene tube together with 9 ml of pH 4.7 0.01 M acetate buffer, using an appropriate equilibration time for the Hg(II) level and then operating as described above.

2.2.4. Calculations

In contact with an aqueous solution containing Hg(II) ions, the following ion-exchange reaction holds in the test strip that is characterised by a constant K_e , and assuming a 1:1 L:Hg stoichiometry:



The activities of Hg(II) and H⁺ in the sample solution determine their concentrations in the membrane. By using the absorbance of the protonated form of chromoionophore, which is the measurable species in the membrane phase, the degree of protonation $1 - \alpha$, defined as the ratio of protonated chromoionophore to its analytical concentration C_0 , is obtained. This normalised absorbance is the analytical parameter used.

The ion activities ratio in the aqueous phase is related to the equilibrium constant K_e and α through the response function:

$$a_{I^{v+}} = \left(\frac{a_{H^+} + \alpha}{1 - \alpha} \right)^v \frac{K_e I / v [(R_0 - (1 - \alpha)C_0)]}{[I_0 - \frac{p}{v}(R_0 - (1 - \alpha)C_0)]^p} \quad (1)$$

where I_0 , C_0 and R_0 are the analytical concentrations of ionophore, chromoionophore and lipophilic anion, respectively.

In this case, the reaction with Hg(II) was irreversible but the shape of the response function fitted Eq. (1) using concentrations instead of activities and experimental data for v and p . Thus, we used this function for calibration purposes and not to explain the model theoretically.

The apparent K_e value required to obtain an optimal fit of the experimental data was calculated according to [17], where values in the maximum slope zone of the calibration graphs were taken for an equilibration time, providing more information and less error.

To obtain the degree of protonation $1 - \alpha$ (Eq. (2)) of the chromoionophore from the spectra we used the maximum and minimum absorbance values (A_{HC^+} and A_C) from the spectra of equilibrated test strips with 1×10^{-2} M HCl and 1×10^{-2} M sodium hydroxide, respectively:

$$1 - \alpha = \frac{[HC]}{[C]_0} = \frac{A - A_C}{A_{HC^+} - A_C} \quad (2)$$

3. Results and discussion

3.1. Membrane composition

To design a disposable test strip the necessary reagents must be selected considering various aspects, such as the extent of the reaction on the solid phase, the rate of response, selectivity and price. This test strip is based on an optical bulk membrane containing all the necessary components for extraction and recognition of mercury dissolved in a plasticised polymeric membrane [26]. The host-guest recognition process of mercury by the ionophore L is coupled to the exchange of a reference ion, a proton, which is reversibly

complexed by chromoionophore C, and acts as a transducer of the recognition process. A highly lipophilic anion R^- is also incorporated in the membrane to provide the needed ion-exchange properties.

The problem of this ionophore-based scheme, which mainly uses crown ethers, is the strong interfering effect of alkali and alkaline earth metal cations. To overcome this problem by decreasing the formation constant of alkali and alkaline earth metal complexes, we tried different commercial aza- and thia-substituted crown ethers with ring size from 9 to 18 as the ionophore, namely, 1,4,7,10,13,16-hexaazacyclooctadecane (C18N6), 1,4,7,10,13,16-hexathiacyclooctadecane (C18S6), 1,4,8,12-tetraazacyclododecane (C12N4), 1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane (C14N4), 1,4,7,10-tetraazacyclododecane (C12N4), 1,4,7-trithiacyclododecane (C10S3), 1,4,7-triazacyclononane (C9N3).

As chromoionophore, 9-dimethylamino-5-[4-(15-butyl-1,13-dioxo-2,14-dioxanonadecyl)phenylimino]benzo[a]phenoxazine, also known as ETH 5418, was selected because has a pK_a value (6.8) [27] compatible with the working pH for heavy metals.

As lipophilic salt we tested potassium tetrakis(4-chlorophenyl)borate, tetrabutylammonium tetraphenylborate, tetraheptylammonium tetraphenylborate, and tetradodecylammonium tetrakis(4-chlorophenyl)borate observing that the last two nearly did not provide a response and the first two gave a similar response to each other, but tetrabutylammonium tetraphenylborate produces films with the best physical properties. Since the plastizisers greatly influenced the selectivity and rate of response, we tested various compounds from different groups such as phosphates esters, ethers, and carboxylic esters, namely TBP, TEHP, NPOE, DOP, and DOS.

We prepared 35 mixtures containing one of the seven ionophores being studied, a chromoionophore and

lipophilic salt ion in 2:1:1 molar ratio, PVC and one of the plastizisers tested. All of the prepared membranes were tested with 0.001 M Ca(II), Mg(II), Mn(II), Fe(III), Ni(II), Ag(I), Zn(II), Cd(II), Hg(II), Cu(II), Pb(II) or Al(III), at pH 4.7, measuring them after 5 min and calculating $1 - \alpha$ (Fig. 1).

When TBP was used as the plastiziser, all the membranes produced a response to mercury with a large equilibrium displacement, as indicated by the low $1 - \alpha$ value, according to the sequence C18N6 > C12N4 > C14N4 > C15N4 \approx C18S6 \approx C9N3 > C10S3. At the same time, alkaline earth metal ions gave a strong response according to: C18N6 \approx C15N4 \approx C14N4 > C18S6 \gg C12N4 > C9S3 > C10S3 as is expected given the hole-size selectivity of crown ethers and size of ions. With TEHP, the ionophore response order was the same as with TBP, although the response level was lower. DOP only gave a response with mercury following the order: C9N3 > C18S6 \approx C10S3 > C15N4 \approx C18N6 > C14N4 > C12N4 and, similarly, DOS only responded to mercury in the order: C12N4 > C10S3 > C18S6 > C9N3 > C15N4 > C14N4 \approx C18N6. The Hg(II) response pattern observed for NPOE was C10S3 \approx C9N3 > C14N4 > C12N4 > C18N6 > C15N4 > C18S6. In spite of the fact that DOS, DOP and NPOE reacted with mercury for all the ionophores that were studied, none of these plastizisers were selected because their reaction rate increased with the plastiziser concentration in the order TBP \gg DOS > DOP > TEHP > NPOE. When TBP was used as the plastiziser, the ionophore selected was 1,4,7,10-tetraazacyclododecane because of its greater response to mercury and lower response to alkali and alkaline earth metal ions.

In the previous experiment, the irreversible nature of the mercury reaction in all membranes was observed, since once a reaction has taken place it does not change with HCl or NaOH addition. The irreversible behaviour of the

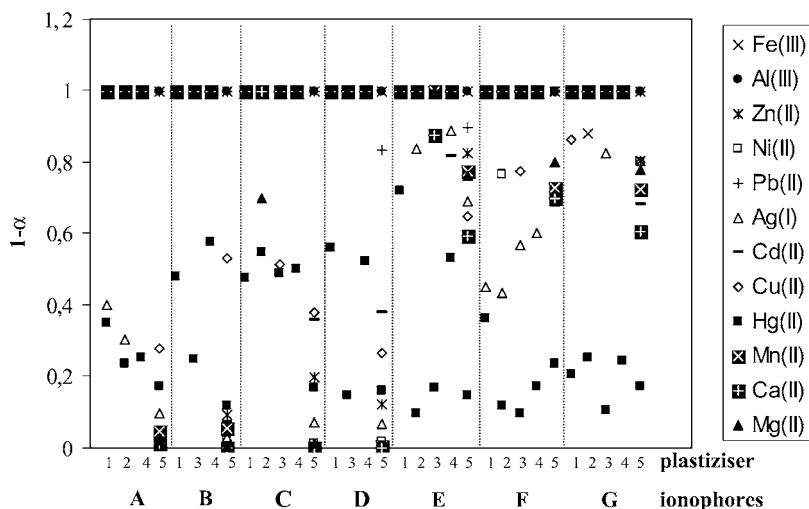


Fig. 1. Response ($1 - \alpha$) for different metals with different plastizisers and ionophores: (1) DOP; (2) DOS; (3) NPOE; (4) TEHP; (5) TBP. (A) C18S6; (B) C18N6; (C) C15N4; (D) C14N4; (E) C12N4; (F) C10S3; (G) C9N3.

Table 1
Selectivity coefficients ($\log K_{\text{aHg}}^j$) for Hg(II) at pH 4.7

R ⁻ /L mole ratio	K(I)	Na(I)	Ca(II)	Mg(II)	Cd(II)	Zn(II)	Fe(III)	Pb(II)	Ni(II)	Cu(II)
1:1	-5.04	-4.28	-2.94	-4.19	-3.59	-	-2.92	-3.91	-3.65	-
1.5:1	-3.58	-3.56	-1.28	-2.65	-2.24	-2.69	-3.18	-3.05	-2.51	-2.92
2:1	-3.40	-2.19	-0.41	-1.62	-1.47	-1.95	-2.34	-2.85	-2.25	-2.38
2.5:1	-3.91	-2.70	-1.07	-2.29	-1.95	-2.21	-2.31	-2.72	-2.36	-2.34

membranes based on neutral ionophores has been described for mercury [28]. Nevertheless, all the reactions of the other metal ions studied are reversible, except for Ag(I). In spite of this, we studied the use of this membrane as a test strip for mercury because reversibility was not an essential condition for a disposable test strip. The irreversible behaviour agreed with the high stability constant K_{Hg} of the mercury complex. The calculated value, from polarographic data, of the 1:1 complex of Hg(II) with 1,4,7,10-tetrazacyclododecane used here as ionophore was 25.5 ± 0.3 (as $\log K_{\text{Hg}}$) [29]. In this case, mercury ion (1.10 Å) is hardly encircled by the macrocycle ring, which reduces the macrocyclic effect compared with the corresponding open-chain analogues. The similarity in $\log K_{\text{Hg}}$ between macrocyclic and open-chain systems (24.5 ± 0.3) results from a combination of a less favourable ΔH value ($-23.6 \pm 0.5 \text{ kcal mol}^{-1}$) arising from the unusual conformational strain or incomplete chelation due to steric constraint, and of a more favourable ΔS value ($37.7 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$) for the former.

To optimise the proportion of the components in the membrane we considered the lipophilic anion/ionophore ratio and the percentage of plastiziser. The optimal composition of the membrane was established considering the selectivity-modifying influence of the lipophilic anion/ionophore ratio. To do this, the apparent selectivity coefficient K_{aHg}^j for the ions Ca(II), Mg(II), Mn(II), Fe(III), Ni(II), Ag(I), Zn(II), Cd(II), Hg(II), Cu(II) and Pb(II) was determined, using the separate solutions method [30] for different membranes at a predetermined equilibration time (5 min); it was observed that this provided enough time to obtain an analytical response in all cases.

Here, the quantity of chromoionophore was kept constant, in an amount necessary to minimise photometric error in the absorbance measurement, while the mole ratio of lipophilic anion to ionophore was varied from 1:1 to 2.5:1. Fig. 2 shows that selectivity decreased on the whole when the ratio increased from 1:1 to 2:1 and that the best selectivity was obtained using a 1:1 lipophilic anion/ionophore ratio. Table 1 shows the K_{aHg}^j values for this ratio.

To optimise the amounts of PVC polymer and TBP plastiziser used for making the membrane, we studied the response time of test strips containing TBP ranging from 50 to 80% weight of the total. The time to reach a nearly stable signal upon reaction of the membrane, without agitation, with $1 \times 10^{-4} \text{ M Hg(II)}$ was 2.3 min for 50%; 1.2 min for 60%; 48 s for 70%; and 55 s for 80%. With amounts higher than 70%, the drying time of the membranes increased and

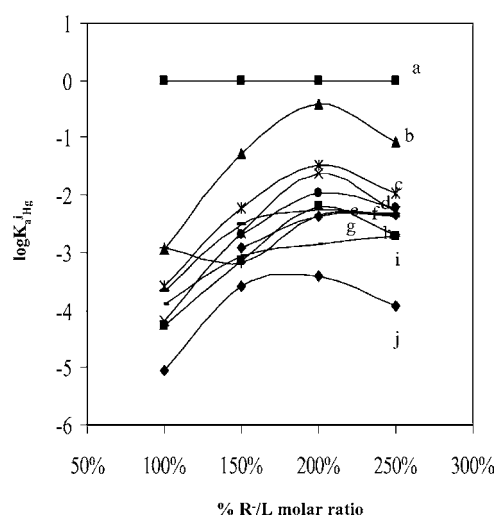


Fig. 2. Selectivity variation of the sensor as function of lipophilic anion/ionophore: (a) Hg; (b) Ca; (c) Cd; (d) Mg; (e) Zn; (f) Ni; (g) Cu; (h) Na; (i) Pb; (j) K.

they were less homogeneous, worsening the physical properties. So, 70% TBP and 30% PVC were selected as the optimum percentages for all the subsequent experiments.

3.2. Reaction parameters

The influence of pH on the membrane response is shown in Fig. 3, observing not only the usual horizontal displacement [26], but a change in slope that can be attributed to the complexity of this metal ion system in aqueous solution with formation of different stoichiometries of hydroxo and acetate pH-dependent complexes of Hg(II). We

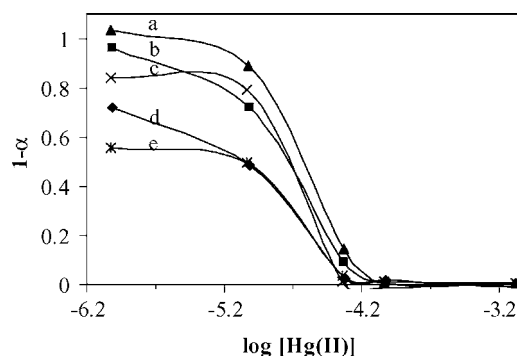


Fig. 3. Effect of pH on sensor response: (a) pH 4.9; (b) pH 4.4; (c) pH 5.4; (d) pH 3.9; (e) pH 5.9.

selected 4.7 as the working pH because of its greater response range. For the buffer, various pH 4.7 acetate buffer solutions 1×10^{-2} M were tested: acetic acid/sodium acetate, acetic acid/potassium acetate, acetic acid/magnesium acetate and acetic acid/lithium acetate. We selected pH 4.7 acetic acid/potassium acetate 1×10^{-2} M because it did not interfere much in comparison with the other buffers, as is to be expected in view of the apparent selectivity coefficient values.

The response time of membranes based on two components is usually not very great, in the range of minutes, if the analyte concentration is not very low [31]. Here, on the contrary, the response time was long, due to the fact that the step that limits the time was not diffusion within the plasticized organic phase but convective mass extraction from the bulk of the aqueous solution to the membrane. In this case, the irreversible behaviour of the test strip due to the large equilibrium constant of the metal–ionophore species made it possible to preconcentrate mercury in the sensing zone if the time of membrane–solution contact increased. Consequently, the equilibration time necessary for the development of the analytical signal was variable depending on the concentration level of the analyte in the sample. In order to increase the speed of the method it was necessary to stir the solution with the test strip to facilitate the transport of the mercury from the core of the solution to the surface of the sensor. Different agitation methods were tried (magnetic stirrer, rotating and vibrating agitator) and it was found that the best results, i.e. a homogenous colouring in the membrane, were achieved using a vibrating agitator operating at 600 oscillations min^{-1} for a concentration level depending on the agitation time (Table 2).

The optical response of the disposable strip based on the C12N4 ionophore to mercury concentrations was studied at two equilibration times of 5 and 60 min, in the first case between 7.9×10^{-6} and 107.8×10^{-6} M and in the second between 0.3×10^{-6} and 5.1×10^{-6} M (Fig. 4). Because of the irreversible character of the reaction and the different species of mercury that may exist in the solution, the slope of the response curve in the linear maximum slope zone does not offer information on the stoichiometry of the reaction.

Table 2

Response $(1 - \alpha)$ vs. equilibration time between strip and 1×10^{-6} M Hg(II) with and without agitation

Time (min)	$1 - \alpha$	
	Without agitation	With agitation
5	0.956	0.868
15	0.921	0.663
30	0.902	0.448
60	0.810	0.320
120	0.705	0.315

Three replicates in all cases.

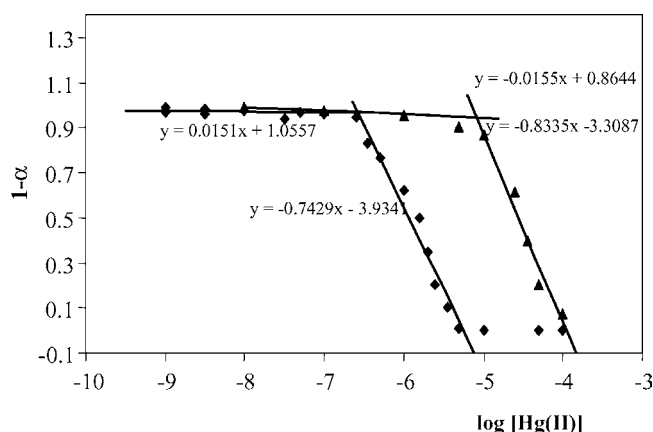


Fig. 4. Calibration plot for Hg(II).

3.3. Analytical parameters

As discussed in a previous article [17], we used the linear relationship in the middle of the sigmoidal response function defined by means of a lack-of-fit test as a measuring range and the intersection of the linear calibration function defined above and a linear function adjusted in the minimal slope zone (background) as the detection limit (DL), as shown in Fig. 4.

We characterised the proposed test strip at two equilibration times: 5 min without agitation and 60 min with agitation using two series of standards each time, the first in the maximum slope zone (five standards, nine replicates each), between 1×10^{-5} and 1×10^{-4} M for 5 min and (nine standards, nine replicates each), between 1×10^{-6} and 1×10^{-5} M for 60 min. The second series was in the minimum slope zone (three standards, nine replicates each one), between 1×10^{-8} and 1×10^{-6} M for 5 min and (six standards, nine replicates each), between 1×10^{-9} and 1×10^{-7} M for 60 min. The linearity of both series was tested by applying the lack-of-fit test [30] and the linear functions obtained were: $1 - \alpha = -3.3087 - 0.8335 \log [\text{Hg(II)}]$ and $1 - \alpha = 0.8644 - 0.0155 \log [\text{Hg(II)}]$, for 5 min, and $1 - \alpha = -3.9341 - 0.7429 \log [\text{Hg(II)}]$ and $1 - \alpha = 1.0557 +$

Table 3

Analytical figures of merit

Parameter	Value, S (5 min)	Value, S (60 min)
Intercept	-3.3087; 0.1403	-3.9341; 0.1193
Slope	-0.8335; 0.0311	-0.7429; 0.0199
Probability level (%) (lack-of-fit test)	6.26	5.04
Detection limit (μM)	7.9	0.3
Linear range (μM)	7.9–107.8	0.3–5.1
R.S.D. ^a (%)	1.1 ($10 \mu\text{M}^b$) 1.8 ($50 \mu\text{M}^b$)	1.8 ($0.5 \mu\text{M}^b$) 1.6 ($2.5 \mu\text{M}^b$)
Lifetime	1 month	
Cost	€ 0.04	

^a R.S.D. for $\log[\text{Hg}^+]$, $n = 3$.

^b Concentration tested.

Table 4
Determination of mercury in different types of water using AAS as a reference method

Matrix	Test strip ($\mu\text{M Hg}$)	S^a	AAS ($\mu\text{M Hg}$)	S^a	P_{val} (%)
Spring water (Durcal, Granada, Spain)	0.39	0.17	0.42	0.09	78.62
Mineral water (Sierras de Jaén)	0.41	0.09	0.39	0.04	73.02
Mineral water (Solán de Cabras)	0.38	0.07	0.36	0.04	64.98
Mineral water (Lanjarón)	0.38	0.09	0.41	0.05	68.93
Mineral water (Mondariz)	0.38	0.17	0.39	0.08	93.26
Mineral water (Bonaqua)	0.43	0.06	0.43	0.06	97.75
Tap water (Granada city)	0.35	0.09	0.38	0.04	89.54
Tap water (Carchuna, Granada)	0.34	0.09	0.40	0.06	40.50
Tap water (Huetor Santillán, Granada)	0.34	0.14	0.30	0.04	89.54

^a Standard deviation, three replicate samples.

0.0151 log [Hg(II)] for 60 min, respectively. The intercept for both functions gives us a DL of 7.9 μM (1.6 mg l^{-1}) for 5 min without agitation and 0.3 μM (60.2 $\mu\text{g l}^{-1}$) for 60 min with agitation.

The upper limit of the measuring range was obtained from the intercept of the linear calibration function with the axis of the abscissa; the value obtained was 107.8 μM for the 5 min procedure and 5.1 μM for the 60 min procedure. Thus, the measuring range for mercury determination is 7.9–107.8 μM (1.6–21.6 mg l^{-1}) and 0.3–5.1 μM (60.2–1023.0 $\mu\text{g l}^{-1}$).

The precision (R.S.D.) using a series of tests strips was obtained at two concentration levels of mercury for the two procedures, namely 10 and 50 μM and 0.5 and 2.5 μM , and 10 replicates of each. The values for the 5 min procedure are 1.1 and 1.8% for log[Hg(II)] and 1.8 and 1.6% for the 60 min procedure. Table 3 shows these and other analytical parameters.

3.4. Application of the method

In order to assess the usefulness of the proposed method for the determination of mercury, it was applied to real samples of waters of various provenance (spring, mineral, and tap). In all cases, recovery studies were made, using 1 ml of water sample spiked with 0.40 μM of Hg(II) mixed with 9 ml of pH 4.7 acetate buffer 0.01 M. Table 4 shows the results obtained using the test strip proposed here compared with cold-vapour atomic absorption spectrometry used as a reference method. Table 4 also includes the mean values from the three determinations of each sample, standard deviations and the probability value (P_{val}) of the test used for the comparison of the measurements obtained for both methods. As can be seen, the results obtained for both methods are statistically similar.

4. Conclusions

We have developed a simple test strip method for the determination of Hg(II) in aqueous samples. The proposed irreversible optical test strip is based on the ionophore 1,4,7,10-tetraazacyclododecane with measurement by trans-

mission, and shows good selectivity toward mercury. The irreversible nature of the reaction of mercury with the sensing membrane containing neutral ionophore, chromoionophore and anionic sites does not impede its use in test strip format for the determination of mercury. An increase in the reaction time would enable the detection of lower mercury concentrations, tailoring the procedure to the problem. All of the reagents needed were sealed in the sensing zone, and thus the determination of Hg(II) here only requires buffering the sample. The proposed test strip offers good results, with an accuracy, precision and cost that make it useful for routine analysis with portable equipment with which it is possible to perform the analysis in situ without prior manipulation.

Acknowledgements

This study was funded by the General Subdirectorate for Training and Knowledge-sharing of the Spanish Ministry of Education and Culture (Project No. BQU2002-00353).

References

- [1] E. Merian, *Metals and Their Compounds in the Environment*, VCH, Weinheim, 1991.
- [2] R.P. Mason, J.R. Reinfelder, F.M.M. Morel, *Water Air Soil Pollut.* 80 (1995) 915.
- [3] C.T. Cosrley, K.F. Mossop, J.R. Dean, L.M. Garden, J. Marshall, J. Carroll, *Anal. Chim. Acta* 405 (2000) 179.
- [4] W.L. Clevenger, B.W. Smith, J.D. Winefordner, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 27 (1997) 1.
- [5] B. Walter, *Anal. Chem.* 55 (1983) 498A.
- [6] P. Vogel, D. Thym, M. Fritz, D. Mosoiu, US Patent 5,302,346 (1994).
- [7] J.H. Priest, E.M. Nelson, US Patent 5,824,491 (1998).
- [8] H. Lange, W. Rittersdorf, H.G. Rey, US Patent 3,897,214 (2001).
- [9] L.F. Capitán-Vallvey, M.D. Fernández-Ramos, P. Alvarez de Cienfuegos, F. Santoyo-Gonzalez, *Anal. Chim. Acta* 481 (2003) 139.
- [10] G. Shi, G. Jiang, *Anal. Sci.* 18 (2002) 1215.
- [11] L.F. Capitán-Vallvey, O.M.A. Al-Barbarawi, M.D. Fernández-Ramos, R. Avidad-Castañeda, V. Ramirez Gonzalez, *Analyst* 125 (2000) 2000.
- [12] M.A.T. Gilmartin, J.P. Hart, D.T. Patton, *Analyst* 120 (1995) 1973.
- [13] G. Shi, G. Jiang, *Anal. Sci.* 18 (2002) 1215.
- [14] R.F. Gur'eva, S.B. Savvin, *J. Anal. Chem.* 58 (2003) 990.

- [15] L.F. Capitán-Vallvey, M.D. Fernández Ramos, Solid-phase spectrometric assays, in: S. Alegret (Ed.), *Integrated Analytical Systems*, Elsevier, Amsterdam, 2003, pp. 81–159.
- [16] H. Hisamoto, N. Miyashita, K. Watanabe, E. Nakagawa, N. Yamamoto, K. Suzuki, *Sens. Actuators B* 29 (1995) 378.
- [17] L.F. Capitán Vallvey, M.D. Fernández Ramos, P. Alvarez de Cienfuegos Galvez, *Anal. Chim. Acta* 451 (2002) 231.
- [18] K. Anand, L. Koon-Wah, EP 0 141 647 (1985).
- [19] M. Fritz, D. Thym, P. Vogel, D. Mosoiu, US Patent 5,211,914 (1993).
- [20] W. Rittersdorf, W. Guethlein, D. Thym, P. Vogel, US Patent 5,215,924 (1993).
- [21] M.L. Gantzer, P.R. Hemmes, D. Wong, EP 0 153 641 (1985).
- [22] S.C. Charlton, EP 0 125 554 (1984).
- [23] K.E. Piejko, B. Bomer, H. Bartl, G. Frank, US Patent 4,780,411 (1988).
- [24] L.F. Capitán-Vallvey, P. Alvarez de Cienfuegos-Gálvez, M.D. Fernández Ramos, R. Avidad-Castañeda, *Sens. Actuators B* 71 (2000) 140.
- [25] K. Seiler, W. Simon, *Anal. Chim. Acta* 266 (1992) 73.
- [26] E. Bakker, P. Bühlmann, E. Pretsch, *Chem. Rev.* 97 (1997) 3083–3132.
- [27] E. Bakker, M. Lerchi, T. Rosatzin, B. Rusterholz, W. Simon, *Anal. Chim. Acta* 278 (1993) 211.
- [28] S. Katama, K. Onoyama, *Anal. Chem.* 63 (1991) 1295–1298.
- [29] M. Kodama, E. Kimura, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* (1976) 2335–2338.
- [30] Analytical Methods Committee, *Analyst* 119 (1994) 2363–2369.
- [31] M. Lerchi, E. Bakker, B. Rusterholz, W. Simon, *Anal. Chem.* 64 (1992) 1534.

IRREVERSIBLE OPTICAL SENSOR FOR MERCURY DETERMINATION BASED ON TETRAARYLBORATE DECOMPOSITION

*C. Cano-Raya, M.D. Fernández-Ramos and L.F. Capitán-Vallvey**

*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, Campus Fuentenueva,
University of Granada, Granada 18071 (Spain).*

Abstract

A new optical disposable sensor to determine mercury is presented. The procedure uses a polyester sheet with a sensing area composed of plasticized PVC that incorporates a tetraarylborate salt as Hg(II) selective recognition reagent and a porphyrin proton-selective fluoroionophore as the optical transducer. The sensing scheme is based on the decomposition of tetraarylborate anion induced by Hg(II) taken by the membrane which compels the deprotonation of the porphyrin, recovering its fluorescence. The fluorescence increases after 15 min contact with Hg(II) at pH 2.4 which makes it possible to determine Hg(II) up to $25 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ with an intermembrane reproducibility of 6.5 % as RSD. The disposable sensor presents good selectivity to Hg(II) over other metal ions. The response mechanism is discussed and the effect of different experimental variables is reported.

Keywords. Mercury determination, Disposable optical sensor; Tetrakis(4-chlorophenyl) borate decomposition; 5,10,15,20-Tetraphenyl-21H,23H-porphine.

* Corresponding author; e-mail: lcapitan@ugr.es

Introduction

The availability of disposable or one-shot sensors for heavy metal ions is of great interest in different areas, mainly public health and the environment. Among these ions mercury is notable for being a toxic element of great environmental concern because it is widespread in the lithosphere and the hydrosphere [1]; [2]. The most widely used techniques for mercury determination include atomic absorption or emission spectrometry, mass spectrometry and voltammetry. For analysis of trace levels of different mercury species, the most widely used approaches are chromatographic methods with spectrometric detectors [3]; [4]. Although these methods are sensitive and accurate, none of them can be used for field screening or on-site assay.

Disposable sensors are miniaturized self-contained analytical devices that respond to the presence or concentration of an analyte or analytes, usually through a chemical or biochemical reaction. The reagents needed to trigger the reactions and processes that lead to the response are incorporated in the element itself, usually in a dry format, in a form that makes it unnecessary to prepare, dispense or mix the needed reagents or perform operations like reaction, extraction, precipitation or dialysis among others.

Different strategies have been used to develop optical or visual disposable sensors for mercury. Examples include: i) conventional inorganic reagents such as Cu_2I_2 incorporated in carboxymethylcellulose membrane on paper for mercury in fish samples [5]; ii) conventional organic reagents such as tyrodine, a rhodanine analogue, retained in membranes of polycapromide, used for mercury in industrial samples with detection limits lower than $5 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ [6]; iii) ionophores in different schemes, such as 1,4,7,10-tetraazacyclododecane in plasticized PVC membrane based on ion-exchange mechanism for mercury in waters [7]; iv) different types of enzymatic inhibition, such as those based on urease inhibition with measurement of the elapsed time until the disappearance of the pH indicator colour used for mercury in waters with a detection limit of $0.2 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ [8]; similarly, the inhibition of horseradish peroxidase immobilized on paper in the reaction of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine oxidation by hydrogen peroxide with a detection limit of $5\text{-}10 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ [9]; [10] has been described; v) antibodies that recognize chelated forms of metal ions such as EDTA for Hg(II) have been used to construct immunoassays [11]; vi) microbial biosensors based on genetically modified firefly luciferase with picomolar range sensitivity [12]. The main problem with these disposable sensors is related to the lack of selectivity to Hg(II) over other heavy metals.

The disposable sensor developed here relies on the decomposition of tetraarylborate anion selectively induced by mercury which leads to phenylmercurial derivatives. This reaction has been used with different purposes in chemical analysis. For instance, gravimetric, titrimetric [13] or spectrophotometric [14] determination of potassium and other alkaline ions or alkaline earths [15]; titrimetric determination of tetraarylborates, both mercurimetry [16] and bromatometry [17]; organomercurial derivatization before analysis by gas chromatography coupled with atomic fluorescence spectrometry or atomic emission spectrometry [18]; in-situ conversion of inorganic mercury to organic mercury combined with the supercritical fluid extraction of the organic mercury [19]; voltammetric Hg(II) determination by monitoring the decrease in the oxidation peak of the tetraphenylborate on a carbon paste electrode [20].

Murkovic and Wolfbeis [21] have used this reaction to develop an optical sensor membrane for the detection of Hg(II) based on a plasticized PVC membrane containing the fluorescent oxacarbocyanine dye and a tetraarylborate salt, whose decomposition induced by Hg(II) leads to the formation of non-fluorescent dye aggregates.

In this paper we apply tetraarylborate decomposition to develop an irreversible disposable sensor for Hg(II) based on the coupling of a proton-selective fluoroionophore in membrane that changes its fluorescence by releasing protons when this metal ion is taken and the lipophilic salt present decomposes.

Experimental

Reagents and materials

The chemicals used were of analytical-reagent grade and all aqueous solutions were prepared using reverse-osmosis type quality water produced by a Milli-RO 12 plus Milli-Q purification system (Millipore, Bedford, MA).

Mercury stock solution ($1,000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) was prepared by dissolving mercury (II) nitrate, $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2\cdot\text{H}_2\text{O}$, (Probus, Barcelona, Spain) in 0.2 M nitric acid and diluted with purified water. Solutions of lower concentration were prepared by dilution with water. Other stock solutions ($1,000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) were prepared in water, with adequate amounts of acid if necessary from nitrate salts of copper and cadmium, calcium, magnesium, sodium (Panreac, Barcelona, Spain), nickel, lead (Merck, Darmstadt, Germany), from sulphate salts of iron (II) (Mohr's salt), iron (III), potassium (Panreac), zinc and manganese (Merck). The solutions were standardized titrimetrically or by using atomic absorption spec-

trometry. A pH 2.4 buffer solution of 1 M was prepared from orthophosphoric acid (Probus) and sodium hydroxide (Panreac).

For preparing the mercury sensitive films, high molecular weight poly (vinylchloride) (PVC), 5,10,15,20-tetraphenyl-21H,23H-porphine (TPP), tributylphosphate (TBP), tris(2-ethylhexyl)-phosphate (TEHP), dioctylphthalate (DOP), bis(2-ethylhexyl) sebacate (DOS), 2-nitrophenyloctyl ether (NPOE), and tetrahydrofuran (THF) were purchased from Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, Spain) and sodium tetraphenylborate (TPB), sodium tetrakis [3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl] borate (BPB), and potassium tetrakis(4-chlorophenyl)borate (TCB) were purchased from Fluka (Fluka, Madrid, Spain). Sheets of Mylar-type polyester (Goodfellow, Cambridge, UK) were used as support.

Apparatus and Software

Steady-state measurements were performed using a Hewlett Packard diode array spectrophotometer (model 8453; Nortwalk, CT, US) interfaced to a Pentium MMX 200 microcomputer via an HP IB interface board for absorption measurement and a Cary Eclipse fluorescence spectrometer (Varian Australia Pty Ltd.) interfaced to a Pentium 4 2.40 GHz via on IEEE-488 (GPIB) for fluorescence measurements. Fluorescence decay measurements were obtained using the time-correlated single photon counting technique with an OB 920 spectrometer with an nF 900-HP nanosecond flash lamp and S900 single photon photomultiplier detection system (Edinburgh Instruments Ltd, Livingston, UK) interfaced to an AMD Athlon™ XP 2400+ 2.00 GHz via an EAI TCC/PCS card. As software for the acquisition and manipulation of the lifetime data, the F900 single photon fluorescence spectrometer software package supplied by Edinburgh Instruments was used.

To obtain the absorbance and luminescence measurements of the disposable sensors, two types of homemade cell holders constructed in a wide black painted iron block and with the appropriate size for each type of spectrophotometer were used. For absorption measurements, the holder had a 5 mm central hole for beam passing and a perpendicular 1 mm wide space for the introduction of the disposable sensor [22]. In the case of luminescence, the measurements were made by transmission and the holder had two 5 mm orthogonal holes and a 1 mm diagonal wide space in such a way that both excitation and emission beams formed angles of 45° with the plane of the sensor [23]. The use of those cell holders improved the reproducibility of the measurements, so measurements were

made in a zone with a constant diameter (5 mm), which was inferior to the diameter of the active zone of the sensor.

The pH values of the solutions were measured using a digital pH meter (Crison Instruments, Barcelona, Spain) calibrated at $20\pm 2^\circ\text{C}$ with standard buffers of pH 7.00 and 4.00 (Merck). The disposable sensors were prepared with a laboratory-made spin-on device [24].

Preparation of disposable membranes and measurement set-up.

The membranes were produced on a polyester substrate using a spin-coating technique. Mixtures for the preparation of mercury-sensitive membranes were made from a batch of 30.0 mg (19.82 wt %) of PVC, 121.0 mg (79.95 wt %) of DOS, 0.10 mg (0.07 wt %) of TPP, 0.24 mg (0.16 wt %) of TCB. The membrane components were dissolved in 1 mL of freshly distilled THF. Using a homemade spin-on device, the single-use membranes were cast by placing 15 μL of the cocktail on a 14 mm x 40 mm x 0.5 mm dust-free thick polyester sheet using a homemade spin-coater [24] rotating at 180 rpm. After spinning for 30 seconds, the membrane was removed from the spin coater and dried in a dryer with saturated THF atmosphere for 3 min at room temperature and then stored in a dark place until use.

The sensing area of the disposable sensor was a transparent and orangey-pink circular film adhered to the polyester 12 mm in diameter and with a calculated thickness of about 22 μm . The calculated concentration of the TPP and TCB in a dry film were 1.07 $\text{mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$ and 3.20 $\text{mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$, respectively.

In order to use the disposable sensors, the following protocol was kept: 10 mL of test solution, containing between 0.1 and 5.3 μM (in concentration) of Hg(II) and 1.0 mL of pH 2.4 orthophosphoric acid/sodium dihydrogen orthophosphate 1 M next to the disposable sensor was placed in a 10 x 1.5 cm polyethylene plastic tube provided with a screw cap and stirred in a vibrating agitator for 15 min at 800 oscillations per minute. Next, the membrane was pulled out from the solution, wiped to remove any solution droplets that might be wetting the surface and its fluorescence was measured at $\lambda_{\text{exc}}=420$ nm using a $\lambda_{\text{em}}=650$ nm with excitation and emission slit widths of 5 nm. The polyester support did not show fluorescence in the measurement conditions used, for which reason, the blank sample was not subtracted in all cases. All measurements were

carried out at room temperature (20 ± 3 °C). The membranes were not conditioned before their use.

Calculations.

The analytical parameter used was a normalized fluorescence α (eq. 1), in fact as $1-\alpha$, where the minimum (F_0) and maximum (F_1) fluorescence values corresponded to the fully protonated and deprotonated (totally reacted with Hg(II)) forms of the luminophore TPP, respectively. These were obtained from measuring the disposable sensors after reaction with pH 2.4 phosphate buffer (F_0) and after reaction with 10^{-4} M Hg(II) solution in the same buffer (F_1).

$$\alpha = \frac{[H_2L^{2+}]}{C_L} = \frac{F - F_0}{F_1 - F_0} \quad \text{eq. 1}$$

The extraction constant K_e was calculated according to ref [25], using values in the maximum slope zone of the experimental response functions for mercury. Activities were calculated according to the two-parameter Debye-Hückel formalism [26]. Software programs used for the treatment of the data and fitting of experimental data to theoretical response function were: Statgraphics software package (Manugistics Inc. and Statistical Graphics Corporation, USA, 1992), ver.6.0 STSC Inc. Statistical Graphics Corporations, USA, 1993 and Graphmatica for Win 32 ver. 1:60d, 1998 edited by K. Hertzler and adapted by J. Garrido.

Results and discussion

Sensing scheme

The sensing scheme used to recognize mercury in this disposable sensor relies on the decomposition of tetraarylborate anion in membrane in the presence of Hg(II) rendering organomercurial derivatives. It is known that in aqueous solution tetraarylborate anion reacts with Hg(II) causing its decomposition through the formation of monophenylmercury, diphenylmercury, and boric acid [28]; [27].

The optical monitoring of this reaction is achieved through the coupling of a proton-selective fluoroionophore or what will be henceforth be called luminophore, which loses its fluorescence by protonation. Initially, the sensing membrane contains the protonated luminophore as an ion pair with the tetraarylborate anion, whose decomposition com-

pels the concomitant deprotonation of lipophilic luminophore to maintain the electroneutrality of the hydrophobic membrane, thus recovering its luminescent emission.

For the luminophore we used a macrocyclic compound, the symmetrically substituted porphin 5,10,15,20-tetraphenyl-21H,23H-porphine, a compound characterized by high symmetry, planarity, and electron delocalization. The membrane when dry was orangey-pink due to the free base form of TPP and had absorption maxima at 420 nm (B band) and four Q bands at 515, 550, 590 and 647 nm. When placed in contact with the acid buffer, the membrane changed to green due to the entrance of protons and subsequent protonation of up to two pyrrolic nitrogens creating a nonplanar configuration of the molecule due to repulsion of the inner hydrogen atoms of the porphyrin ring [29], which modified the absorption spectrum, rendering a B band at 440 nm and two Q bands at 600 and 658 nm. All these absorption bands of TPP in plasticized PVC membrane followed the same pattern as in other solvents [30], [31]; [29].

The fluorescence spectrum of the membrane corresponding to free base and containing TCB as tetraarylborate anion, showed two bands at 650 and 716 nm, while the protonated form showed a very lightly intense band at 692 nm. The disposable sensor when dry showed a fluorescence with an average lifetime of 10.6 ns, which contrast with the 142 ns described in benzene [32], but when introduced in acidic medium both the intensity and lifetime of the fluorescence of the membrane decreased dramatically. Thus, by introducing a disposable membrane into a pH 2.4 buffer, the average lifetime decreased from 10.6 ns to 2.8 ns. But the fluorescence lifetime of those membranes after exposure to a $1.0 \cdot 10^{-4}$ M Hg (II) solution increased their lifetime up to the initial fluorescence values ($\bar{t} = 11.0$ ns) due to the regeneration of the π -electron conjugated double-bond system of porphyrin. All these fluorescence lifetimes of the disposable membranes fit with a biexponential decay [dry membranes: τ_1 11.3 ns (93%); τ_2 0.6 (7%); χ^2 1.665; membranes at pH 2.4: τ_1 1.1 ns (92%); τ_2 20.9 (8%); χ^2 1.718; membranes at pH 2.4 after reaction with Hg(II): τ_1 13.2 ns (68%); τ_2 6.2 (32%); χ^2 1.400].

Optimisation of sensor response

The response of this irreversible disposable sensor is influenced by different factors: i) composition of the membrane related to proportions of the cocktail components, and conditions used for membrane making; and ii) reaction process between the sample solution and the disposable sensor related to pH, contact time and analyte activity.

Membrane composition. As an indicator of tetraarylborate decomposition by Hg(II) we selected a macrocyclic compound, the symmetrically substituted porphin 5,10,15,20-tetraphenyl-21H,23H-porphine because of: i) its intense fluorescent emission in the visible region due to the conjugated double-bond system and the high mobility of π -electrons (quantum yield 0.13 in benzene [32]); ii) its high lipophilicity that makes its immobilization in the membrane polymer PVC possible and the maintenance of its spectral properties; and iii) the loss of fluorescent emission in acidic medium by protonation of the two heterocyclic nitrogens and subsequent elimination of π -system conjugation [33].

Different tetraarylborate anions were tested in PVC membrane: tetraphenylborate (TPB), tetrakis(4-chlorophenyl)borate (TCB) and 3,5-bis(trifluoromethyl)phenylborate (BPB). It was observed that in the absence of borate the membrane does not lose the fluorescence when exposed to the acidic medium, because the protons cannot be extracted to the membrane and do not respond to Hg(II). Additionally, this behaviour of the membrane is irreversible due to tetraarylborate decomposition, as demonstrated by the fluorescence decrease observed when a disposable sensor that has already reacted with mercury is exposed to a 50 μ M aqueous solution of TCB. This decrease is due to borate extraction to membrane that enables TPP protonation and the consequent loss of fluorescence [21].

Sensitivity to Hg(II) decreases with the lipophilicity of the tetraarylborate anion present in the membrane, which is related to the substituent present in the molecule and with its chemical stability [34], similar to that found by Murkovic and Wolfbeis [21] in their study of a sensing membrane for Hg(II) based on oxacarbocyanine dye. We found that the more stable BPB shows no response to Hg(II), while with TPB and TCB (TPB>TCB) fluorescence recovers rapidly. However, although TPB causes a higher signal we observe some leaching from the membrane which introduces more irreproducibility in the response of the disposable sensors, and therefore TCB was selected as a compromise for next experiments.

The type of membrane plasticizer exhibits a strong influence on the response of the membrane to Hg(II); thus to select the plasticizer we conducted a preliminary study with different plasticizers (TBP, TEHP, NPOE, DOS, and DOP), monitoring the response signal against a 10^{-6} M Hg (II) solution.

The sensitivity, understood to be the value of the signal, i.e. the increase in fluorescence, for a given metal ion concentration, as well as the response time of the different disposable sensors towards Hg(II), increased with the plasticizer in the order: ethers > carboxylic esters > phosphate esters, namely NPOE>DOS>DOP>TEHP>TBP (100; 84; 46; 23; 7 in percentage). Due to the similar response to Hg (II) ions provided by NPOE and DOS, an experiment was done considering the response time (Figure 1) and DOS was selected as plasticizer for all subsequent experiments because of its faster response than that of NPOE at the same Hg(II) concentration.

Figure 1

To select the membrane plasticizer percentage we studied the response time and physical properties of membranes containing different amounts ranging from 50% wt to 80% wt in DOS (Figure 1). For these experiments, the sensor response to a 10^{-6} M Hg (II) solution was measured at different times while the membrane was maintained in shaking. The response time to reach the equilibrium ($t_{95\%}$) was measured with different membranes obtaining: 57 min for 50%; 51 min for 60%, 39 min for 68 %, and 36 min for 80%. With amounts higher than 80%, the physical properties are worse because the membrane loses homogeneity and the drying time increases considerably. 80% of DOS and 20% PVC were chosen for membrane hereafter.

To optimise the amount of luminophore TPP, different membranes M1–M6 were prepared from cocktails containing 0.05; 0.10; 0.20; 0.30; 0.50 and 1.20 mg of selected porphyrin and twice the amount of TCB lipophilic salt in moles. Three membranes of each type were tested against a 10^{-6} M Hg (II) solution. The largest difference between blank (membrane in buffer) and analyte (membrane in buffer plus Hg(II) solution) was observed for membranes of M2 type (Figure 2), for which reason we used cocktails containing 0.10 mg of TPP for the subsequent experiments.

Figure 2

The luminophore/lipophilic anion ratio was also considered to optimise the membrane composition. Membranes with different molar ratio were tested (1:1, 1:2 and 1:3) against a 10^{-6} M Hg (II) solution, observing that the fluorescence increase grows with the molar ratio (83; 93; 100%), for which reason membranes with a 1:3 molar ratio were selected for mercury sensing purposes.

The preparation of disposable sensors was achieved by spreading and evaporation of a solution of components on a polyester support forming membranes with good mechanical and optical properties. The minimum volume would be that which is adequate to

obtain a diameter and thickness of the sensing zone which ensures that the diameter of the formed circular film is slightly lower than the width of the sheet of polyester used, and higher than the width of the radiation beam of the spectrophotometer and where the fluorescence is not excessively high (15 μ L in this case). The reproducibility of the membrane preparation calculated from the initial fluorescence before contact with buffer is 7% (n=36).

Reaction parameters. The response of this disposable optical sensor depends on proton activity, due to the necessary initial obliteration of fluorescence by protonation of two free heterocyclic nitrogens, a process facilitated by the lipophilic salt present in the membrane. The fluorescence of membranes disappears below pH 4, growing then at higher pH values as usual in any system controlled by an acid-base equilibrium (Figure 3). From this data a rough estimation of equilibrium constant K considering a single protonation equilibrium ($K = K_{a3} \cdot K_{a4}$) gives a value of 5.6×10^{-8} .

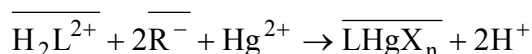
Figure 3

As working pH we selected 2.4, with very similar results for other pH values less than 4.0. Different buffers were tested as the working buffer, such as phosphate, dichloroacetate, formiate, propionate and acetate. A pH 2.4 orthophosphoric acid/dihydrogen phosphate in a final concentration of 0.1 M was selected as the buffer due to its good results and lesser interference that it produces than the others.

The response time was long, due to the fact that the step that limits the time was not only the diffusion within the plasticized organic phase and the reaction in membrane but the convective mass extraction from the bulk of the aqueous solution to the membrane. In order to increase the speediness of the method it was necessary to stir the solution with the test strip to facilitate the transport of the mercury from the core of the solution to the surface of the sensor. Different agitation methods were tried (magnetic stirrer, rotating, vibrating agitator and ultrasound bath) and it was found that the best results, i.e., a homogenous colouring in the membrane and higher reproducibility, were achieved using a vibrating agitator operating at 800 oscillations per minute. From the experiments to select the optimal percentage of DOS (Figure 1), 15 min as reaction time was selected because at this time 80% of the maximum signal is obtained, a compromise between sensitivity and speediness.

Response mechanism

The response of disposable sensors to mercury activities was studied between $9.3 \cdot 10^{-12}$ M and $9.2 \cdot 10^{-5}$ M in activities ($1.0 \cdot 10^{-11}$ M and $1.0 \cdot 10^{-4}$ M in concentrations) at pH 2.4. From the experimental data, we propose that the mercury sensing could be described by the following global reaction, if it is assumed that L and R⁻ are the luminophore and the tetraarylborate anion, respectively and X is a decomposition product of R⁻:



in which barred species are in membrane phase, while all other chemicals are in aqueous solution. Figure 4 (curve d) shows a good fit of this model characterized by eq. 2 with experimental data.

$$a_{\text{Hg}^{2+}} = \frac{C_L \cdot \alpha \cdot a_{\text{H}^+}^2}{(1 - \alpha) \cdot C_L \cdot (C_R - C_L \alpha)^2 \cdot K_e} \quad (\text{eq. 2})$$

The fit by least-squares of the experimental points, in the linear maximum slope zone of the response curve for Hg(II) to the theoretical model, gives for $\log K_e$ the value 6.5 ± 0.1 .

Figure 4

We assume that the Hg(II) ion goes into the membrane by ion-exchange, as can be inferred from the intense interference caused by chloride, which prevents the ion-exchange from non-dissociated HgCl₂ and also considering that Montequi et al. indicate that decomposition of tetraarylborate anion in aqueous solution occurs with Hg(II) as HgCl₂ thus forming HgCl(C₆H₅) mainly [28]. Next, Hg(II) reacts in membrane with tetraarylborate to produce an organomercurial associated with porphyrin. We hypothesize that tetraarylborate decomposition occurs in membrane phase and not in the inter-phase aqueous solution to membrane, because of the lack of fit of experimental data to the theoretical model which involves monophenylmercury formation or diphenylmercury (curve b in Figure 4) in aqueous solution in addition to the chloride interference data.

In our case, we found that the decomposition of lipophilic tetraarylborate does not lead to a mercury-porphyrin complex formation, because of the very slow rate of metalloporphyrin formation [35] as a result of the difficulty in deforming the porphyrin ring to form “sitting-atop” complexes usual for large-sized transition metal ions such as mercury [36]. However, Chan et al. [37] claim that mercury-TPP porphyrin complex formation is fast (4 min) in plasticized PVC membrane at pH 8.0. Those authors ascribe the sensing mechanism to the ion-exchange process between two protons of free base TPP

(corresponding to K_{a1} and K_{a2} constants) and Hg(II). Additionally, a second reason that supports the lack of formation of a mercury-porphyrin complex in our membrane is that we observed a concomitant fluorescence increase when the mercury concentration increases, contrary to that described by Chan et al. [37] who found fluorescence quenching due to the formation of mercury-porphyrin complex in PVC membrane, a quenching that they used as their analytical parameter.

As the reaction product of the mercury sensing process, we accept the formation of an association that includes free base porphyrin TPP and a mercurial decomposition product of tetraarylborate, while any other model supposing the presence of differentiated free TPP and decomposition product does not fit with our experimental data (curves a and c in Figure 4).

Analytical Parameters

We have tried two types of calibration functions for the disposable membrane studied, one of them based on the sigmoidal shape response function previously defined by eq. 2 and other using a linear relationship at low Hg(II) concentrations.

To define and characterize the analytical function based on the logarithmic relationship between $1-\alpha$ and Hg(II), two series of standards were used, one in the maximum slope zone (3 standards, 3 replicates each one), between $2.8 \cdot 10^{-7}$ and $1.4 \cdot 10^{-6}$ in activities and another in the minimum slope zone of lower activity (4 standards, 3 replicates each one), between $5.5 \cdot 10^{-12}$ and $5.5 \cdot 10^{-8}$ in activities. The linearity of both series was tested by applying the lack-of-fit test [38] and the linear functions obtained were, respectively: $1-\alpha = -0.7822 - 4.329 \cdot \log a_{\text{Hg}}$ and $1-\alpha = -0.008 + 0.9069 \log a_{\text{Hg}}$. The detection limit obtained by the interception of both functions is $0.2 \mu\text{M}$ in activities ($0.3 \mu\text{M}$ in concentration; $63 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) (Figure 5). As the upper limit of the measuring range the higher concentration that statistically fit the linear function was used; this was $2.9 \mu\text{M}$ ($5.3 \mu\text{M}$ in concentration). Thus, the measuring concentration range for mercury determination is between 0.3 and $5.3 \mu\text{M}$.

Figure 5

The precision expressed as sensor-to-sensor repeatability with different disposable sensors, expressed as relative standard deviation, was obtained at two activity levels: 0.4 and $1.4 \mu\text{M}$ using eight replicates of each one and had values of 0.36 and 1.04% for $\log a_{\text{Hg}}$ (Table 1).

Table 1

A linear relationship could be found for calibration purposes using as analytical parameter the fluorescence intensity difference between membranes with Hg(II) and blank ($F-F_0$). Figure 5 shows that the $F-F_0$ variation with mercury concentration between 10^{-4} and 10^{-11} M is composed of two linear stretches, of which we used that with lower concentrations as analytical function ($F-F_0 = 8.2 \cdot 10^7 [\text{Hg(II)}] + 29.1$). The detection limit calculated as $3 \cdot \text{SD}(\text{blank})/\text{slope}$ according to IUPAC was $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($25 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) of Hg(II). The saturation limit was calculated from the intersection point of the above linear calibration function and the function independent of mercury concentration ($F-F_0 = 6.5 \cdot 10^5 [\text{Hg(II)}] + 242.9$). Accordingly, the linear dynamic range for mercury determination in aqueous samples covers concentrations from 0.1 to $2.6 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Hg(II) (25 to $528 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$). The precision (RSD) using a series of sensors was obtained at two concentration levels of mercury, namely 0.25 and $2.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, and eight replicates each. The values were 23.9 and 6.5% for [Hg(II)], respectively (Table 1). The stability of the irreversible disposable sensor described here was tested with a series of membranes checked at a Hg(II) concentration in the middle of the range and preserved dry and protected from light for at least one and half months.

Comparing the proposed membrane with other optical membranes based on similar principles or similar reagents, we found that the analytical performance of the disposable sensor described here is similar to the optical membrane described by Murkovic and Wolfbeis [39]; [21] used in an usual flow scheme (40 - $650 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) although the exposure time needed is higher (30 min) in that case; analogously, the procedure by Chan et al [37] previously cited, works between 40 and $9000 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ although it does not refer to a linear dynamic range but to the full dynamic range.

Our results obtained compare with some other optical or visual disposable sensors described to date. For instance, the Hg(II) rapid determination procedure based on *p*-phenylazo-3-aminorhodanine immobilized on a polyacrylonitrile fiber filled with a finely dispersed cation exchanger was proposed for the concentration range 50 to $500 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ [40]. The test method based on tyrodine in a polycaproine membrane is described between 40 and $2000 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ [6]. The dip-and-read test strip for Hg(II) based on the inhibition of urease has a detection range from 0.2 to $200 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ [8].

The influence of potential interferents, such as alkaline, alkaline earth, heavy-metal ions, as well as some anions, on the determination of Hg(II) was studied at a $0.28 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ level. The interferent species were tested at different concentration levels and if inter-

ference occurred, its concentration was reduced until the error produced did not exceed $\pm 5.0\%$ in the determination of the analyte, this concentration value defined as tolerance. All ions tested caused negligible effect on Hg(II) determination with the exception of chloride due to complex formation discussed above (Table 2).

Table 2

Conclusion

An irreversible optical disposable sensor has been developed for mercury using as selective recognition reaction the decomposition of lipophilic tetraarylborate present in the membrane induced by mercury and as optical transducer a proton-selective fluoroionophore that loses its fluorescence by protonation. The disposable sensor has been implemented in a transparent membrane that works by ion exchange offering an easy-to-measure analytical signal. The irreversible nature of the reaction of mercury with the sensing membrane containing reagents does not impede its use in disposable sensors for the determination of mercury. All of the reagents needed were sealed in the sensing zone, and thus the determination of Hg(II) here only requires buffering the sample.

Drawbacks are related to chloride interference and response time, which in the developed format is roughly 15 minutes due to diffusion and reaction within the polymeric membrane, but could be reduced by using porous supports.

Acknowledgements

We acknowledge financial support from the *Ministerio de Educacion y Cultura, Dirección General de Enseñanza Superior* (Spain) (Project No. BQU2002-00353).

References

1. E. Merian, *Metals and Their Compounds in the Environment*, VCH, Weinheim, 1991.
2. R.P. Mason, J.R. Reinfelder, F.M.M. Morel, *Water Air Soil Poll.* 80 (1995) 915-921.
3. C.T. Costley, K.F. Mossop, J.R. Dean, L.M. Garden, J. Marshall, J. Carroll, *Anal.Chim.Acta* 405 (2000) 179-183.

4. W.L. Clevenger, B.W. Smith, J.D. Winefordner, *Crit.Rev.Anal.Chem.* 27 (1997) 1-26.
5. A.V. Yallouz, *Fresenius J.Anal.Chem.* 366 (2000) 461-465.
6. R.F. Gur'eva, S.B. Savvin, *J.Anal.Chem.* 58 (2003) 990-994.
7. L.F. Capitán-Vallvey, C. Cano-Raya, E. Lopez Lopez, M.D. Fernandez Ramos, *Anal.Chim.Acta* 524 (2004) 365-372.
8. G.-Q. Shi, G. Jiang, *Anal.Sci.* 18 (2002) 1215-1219.
9. S.V. Muginova, N.A. Akovbyan, T.N. Shekhovtsova, *J.Anal.Chem.* 54 (1999) 569-573.
10. I.A. Veselova, I.F. Dolmanova, S.V. Muginova, T.N. Shekhovtsova, *J.Anal.Chem.* 57 (2002) 1120-1128.
11. D.A. Blake, R.C. Blake II, M. Khosraviani, A.R. Pavlov, *Anal.Chim.Acta* 376 (1998) 13-19.
12. M. Virta, J. Lampinen, M. Karp, *Anal.Chem.* 67 (1996) 667-669.
13. H. Flaschka, F.S. Sadek, *Chemist-Analyst* 47 (1958) 30-31.
14. H. Huber, H. Raber, K. Dvorak, K. Kalcher, *Mikrochim.Acta* 1 (1982) 155-158.
15. S.C. Su, M.H. Chang, C.L. Chang, P.C. Chang, S.S. Chou, *Yaowu Shipin Fenxi* 11 (2003) 114-127.
16. R. Montequi, A. Doadrio, C. Serrano, *An.R.Soc.Esp.Fis.Quim.* 53 (1957) 447-452.
17. R. Montequi, A. Doadrio, C. Serrano, *An.R.Soc.Esp.Fis.Quim.* 54B (1957) 29-34.
18. Y. Cai, S. Monsalud, R. Jaffe, R.D. Jones, *J.Chromatog.A* 876 (2000) 147-155.
19. Y.C. Sun, Y.T. Chung, M.H. Yang, *Anal.Commun.* 34 (1997) 333-334.

20. I. Svancara, K. Vytras, C. Hua, M.R. Smyth, *Talanta* 39 (1992) 391-396.
21. I. Murkovic, O.S. Wolfbeis, *Sens.Actuators B: Chem.* B39 (1997) 246-251.
22. L.F. Capitán-Vallvey, P. Alvarez de Cienfuegos, M.D. Fernández-Ramos, R. Avidad-Castañeda, *Sens.Actuators B: Chem.* 71 (2000) 140-146.
23. L.F. Capitán-Vallvey, O.M.A. Al-Barbarawi, M.D. Fernández-Ramos, R. Avidad-Castañeda, V. Ramirez Gonzalez, *Analyst* 125 (2000) 2000-2005.
24. K. Seiler, W. Simon, *Anal.Chim.Acta* 266 (1992) 73-87.
25. L.F. Capitán-Vallvey, M.D. Fernández-Ramos, P. Alvarez de Cienfuegos, *Anal.Chim.Acta* 451 (2002) 231-241.
26. P.C. Meier, *Anal.Chim.Acta* 136 (1982) 363-368.
27. G. Wittig, P. Raff, *Ann.* 573 (1951) 195-209.
28. R. Montequi, A. Doadrio, C. Serrano, *Publ.Inst.Quim.Alonso Barba (Madrid)* 10 (1956) 183-188.
29. A. Stone, E.B. Fleischer, *J.Am.Chem.Soc.* 90 (1968) 2735-2748.
30. J.B. Kim, J.J. Leonard, F.R. Longo, *J.Am.Chem.Soc.* 94 (1972) 3986-3992.
31. J.I. Itoh, T. Yotsuyanagi, K. Aomura, *Anal.Chim.Acta* 74 (1975) 53-60.
32. D.J. Quimby, F.R. Longo, *J.Am.Chem.Soc.* 97 (1975) 5111-5117.
33. J. Janata, M. Josowicz, P. Vanysek, D.M. Denvany, *Anal.Chem.* 70 (1998) 179R.
34. T. Rosatzin, E. Bakker, K. Suzuki, W. Simon, *Anal.Chim.Acta* 280 (1993) 197-208.
35. M. Biesaga, K. Pyrzynska, M. Trojanowicz, *Talanta* 51 (2000) 209-224.
36. M. Tabata, M. Tanaka, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 10 (1991) 128-133.

37. W.H. Chan, R.H. Yang, K.M. Wang, *Anal.Chim.Acta* 444 (2001) 261-269.
38. Analytical Methods Committee, *Analyst* 119 (1994) 2363-2366.
39. G.J. Mohr, I. Murkovic, F. Lehmann, C. Haider, O.S. Wolfbeis, *Sens.Actuators B: Chem.* 39 (1997) 239-245.
40. S.B. Savvin, L.M. Trutneva, O.P. Shvoeva, K.A. Efendieva, *Zhurnal Analiticheskoi Khimii* 46 (1991) 709-713.

Figure captions

Figure 1. Time response of sensor membranes with plasticizer percentage: a) 50% DOS; b) 68% NPOE; c) 60% DOS; d) 68% DOS; e) 80% DOS. $[\text{Hg(II)}] = 10^{-6}$ M. Agitation with vibrating agitator operating at $800 \text{ oscillations} \cdot \text{min}^{-1}$.

Figure 2. Influence of the TPP amount in membrane.

Figure 3. Dependence of PVC membrane fluorescence of TPP with pH.

Figure 4. Response of disposable membranes Hg(II). Solid circles: experimental points with error bars; Solid lines are theoretical response curves according to:

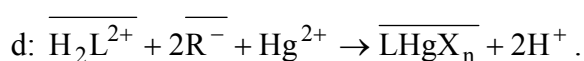
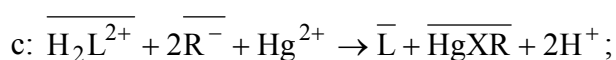
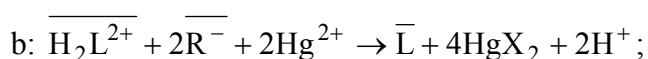
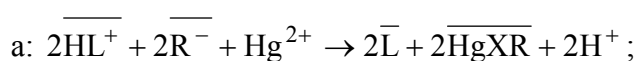


Figure 5. Calibration plot for Hg(II): a) logarithmic calibration from eq. 2; b) linear calibration.

Table 1. Analytical Figures of Merit.

Parameter (value; S)	Calibration	
	Logarithmic	Linear
Intercept	-4.3; 0.2	29.1; 2.1
Slope	-0.78; 0.04	$8.2 \cdot 10^7$; $1.9 \cdot 10^6$
Probability level % (lack-of-fit test)	15.4	5.9
Linear range (μM)	0.3-5.3	0.1-2.6
Detection limit (μM)	0.3	0.1
RSD (%) Intersensor	0.36^{a} ($0.40 \mu\text{M}^{\text{b}}$)	23.9^{c} ($0.25 \mu\text{M}^{\text{d}}$)
	1.04^{a} ($1.40 \mu\text{M}^{\text{b}}$)	6.5^{c} ($2.5 \mu\text{M}^{\text{d}}$)
Stability	1.5 month	
Cost	€ 0.16	

a: RSD for $\log a_{\text{Hg}}$; b: activity tested; c: RSD for $[\text{Hg}(\text{II})]$; d: concentration tested

Table 2. Effect of potential interferents on Hg(II) disposable sensor. [Hg(II)] = 0.28 mg.L⁻¹

Interferent	Tolerance (mg·L ⁻¹)
Mg (II)	>60.0*
Ca (II)	>140.0*
Na (I)	1500.0
K (I)	>4.0*
Pb (II)	>2.0*
Fe (III)	>2.0*
Fe (II)	>2.0*
Ni (II)	>2.0*
Zn (II)	>2.0*
Cu (II)	>2.0*
Cd (II)	>2.0*
Mn (II)	>2.0*
Co (II)	>2.0*
Cl ⁻	0.5
NO ₃ ⁻	>200.0*
SO ₄ ²⁻	250.0
PO ₄ ³⁻	6100.0

* Maximum amount tested.

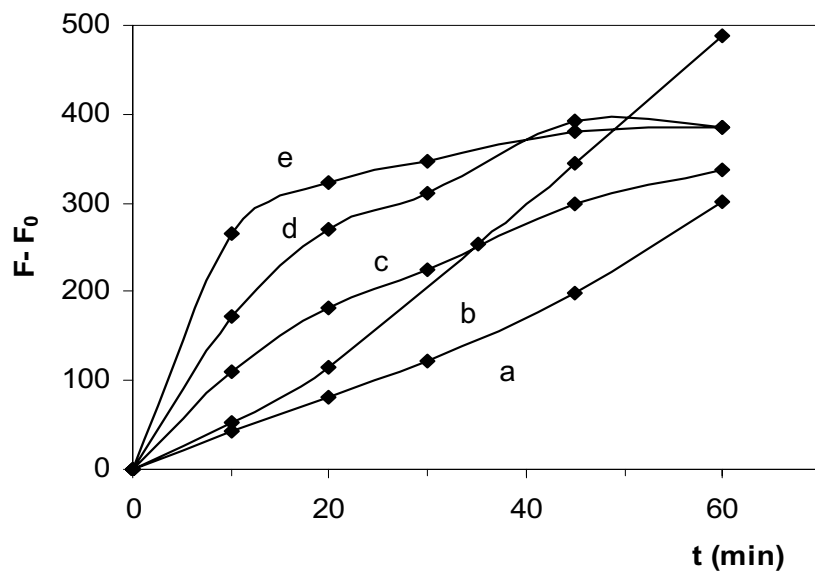


Figure 1

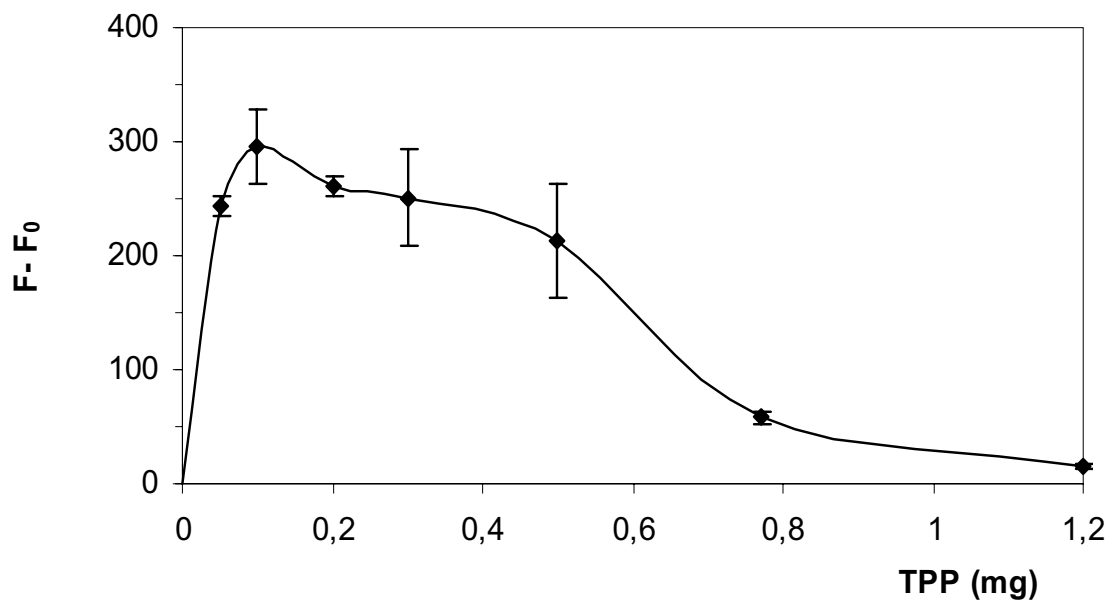


Figure 2

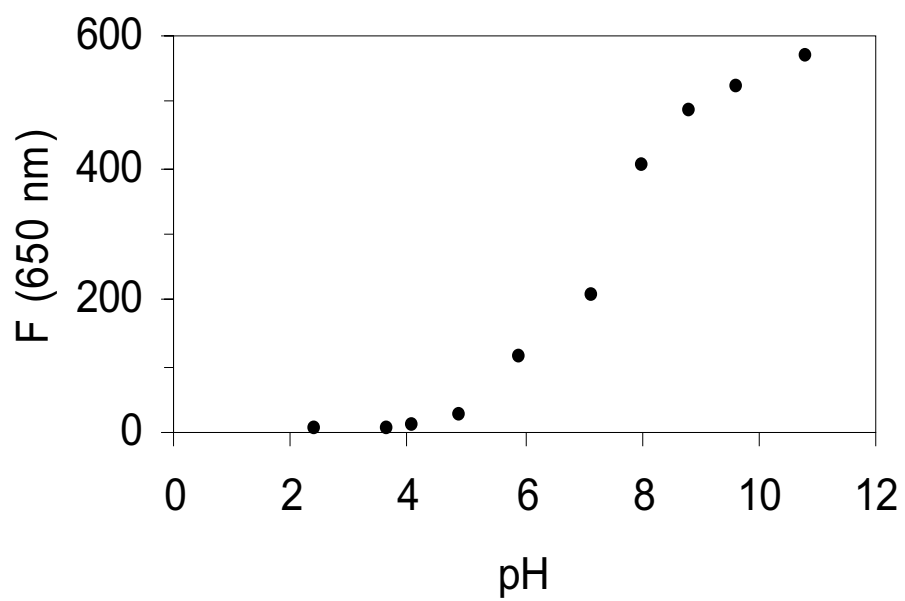


Figure 3

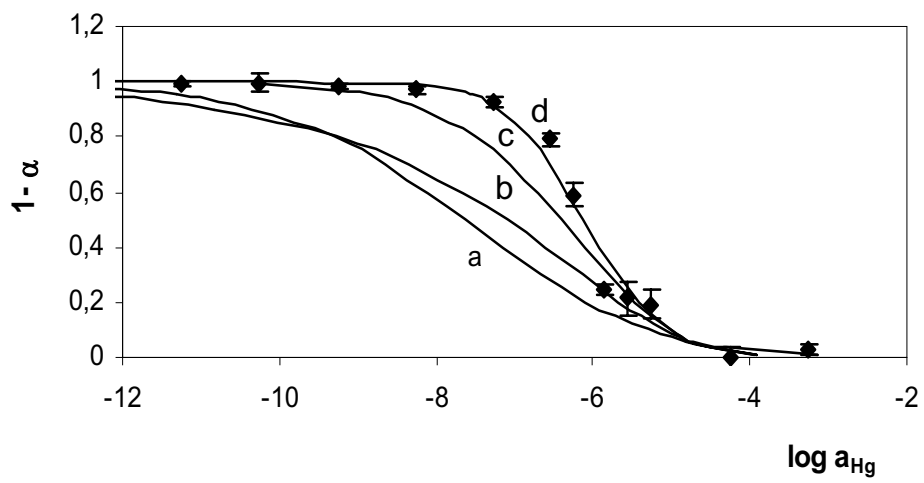


Figure 4

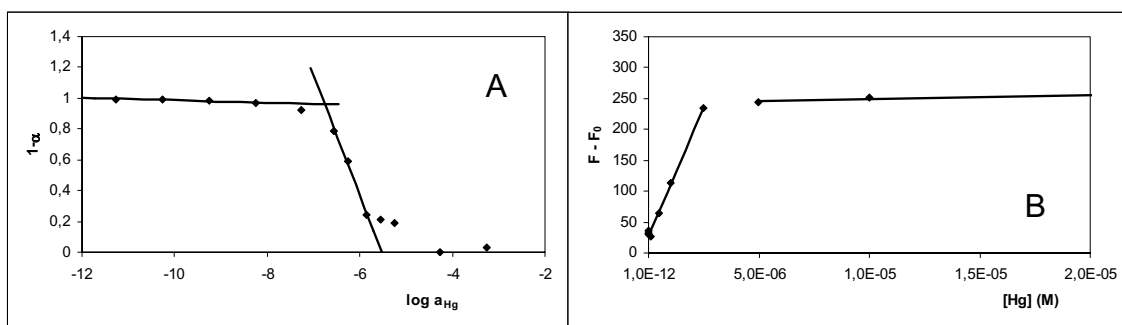


Figure 5

FLUORESCENCE QUENCHING OF THE EUROPIUM TETRACYCLINE HYDROGEN PEROXIDE COMPLEX BY COPPER (II) AND OTHER METAL IONS

Clara Cano-Raya^a, María. D. Fernández Ramos^a, Luís. F. Capitán Vallvey^a, Otto S. Wolfbeis^b and Michael Schäferling^{b*}

^aDepartment of Analytical Chemistry, University of Granada, Granada 18071 (Spain).

^bInstitute of Analytical Chemistry, Chemo- and Biosensors, University of Regensburg, 93040 Regensburg (Germany).

Abstract

The europium-tetracycline complex [Eu(Tc)] is known to show only weak fluorescence with an emission maximum at 615 nm. On addition of hydrogen peroxide (HP), the strongly fluorescent [Eu(Tc)(HP)] complex is formed, which displays a 15-fold stronger luminescence intensity. This study describes the decrease in luminescence intensity of the [Eu(Tc)(HP)] complex in aqueous solution in the presence of Cu²⁺, Fe³⁺, Ag⁺, Al³⁺, Zn²⁺, Co²⁺, Ni²⁺, Mn²⁺, Ca²⁺ and Mg²⁺. Static and dynamic quenching can be induced by Cu²⁺, and these processes were quantified by means of their quenching constants. Stern-Volmer plots were also derived from lifetime imaging measurements accomplished by the Rapid Lifetime Determination (RLD) technique based on microwell plate assays, and also by the Time-Correlated Single Photon Counting technique (TCSPC). According to those data, a time-resolved fluorescent method for copper determination can be proposed which is based on dynamic quenching of the [Eu(Tc)(HP)] complex by Cu²⁺ ions. The response to copper concentrations is linear up to 1.6 μmol L⁻¹, providing a detection limit of 0.2 μmol L⁻¹.

Index Headings: heavy metal quenching; time-resolved fluorescence imaging; single photon counting technique; europium tetracycline hydrogen peroxide ternary complex; copper determination.

* Corresponding author: Dr. Michael Schäferling, Tel: +49 (0)941 943 4015, Fax: +49 (0)941 943 4064,

E-mail: michael.schaeferling@chemie.uni-regensburg.de

INTRODUCTION

Complexes of Eu^{3+} with different organic ligands are promising candidates as luminescent probes and stains for biomolecular systems and are extensively investigated for more than 25 years now.¹ (Immuno)histochemical staining is nowadays an important method which is widely used for scanning tissue samples or cell cultures for biomolecular interactions.² The use of europium chelates as labels for proteins or antibodies, with their outstanding properties like long fluorescence decay times in the μs range, Stokes shifts of more than 200 nm, and a line-like emission, has resulted in time-resolved detection techniques such as time-resolved fluoroimmunoassays (TRFIA).³⁻⁸ Functionalized lanthanide complexes are also used as labels for DNA and proteins, and are applicable as donors in assays based on time-resolved resonance energy transfer (RET).⁹⁻¹¹ Time-resolved measurements enable the suppression of fluorescent back-ground signals (noise) by collecting the emitted fluorescence signal within time gates in the μs range, whereas the autofluorescence of other biological species decays in the ns range.

The commonly observed sensitization mechanism for luminescent europium complexes involves a triplet pathway. The transfer of the energy absorbed by the ligand to the Eu^{3+} occurs from the ligand triplet excited state (T_1). The optical excitation window is limited to wavelengths below 380 nm.¹² With the use of “antenna” chromophores as ligands, which have a smaller energy gap between the lowest singlet excited state (S_1) and the T_1 state, the excitation wavelength can be shifted into the visible region. Furthermore, longer-wavelength excitation of the Eu^{3+} emission can be achieved due to a singlet pathway, in which the energy of the S_1 state of the chromophore is directly transferred to the luminescent states of the europium center.¹³

The antibiotic tetracycline is known to act as an antenna ligand for europium ions.¹⁴ The Eu(III) -tetracycline complex can bind H_2O_2 to form the strongly fluorescent complex $[\text{Eu(Tc)}(\text{HP})]$ with an absorption maximum around 400 nm. The addition of H_2O_2 to the $[\text{Eu(Tc)}]$ complex induces a 15-fold increase in luminescence intensity at 615 nm, due to the replacement of a water ligand and formation of a peroxo complex¹⁵. This is, in the case of a 3:1 molar ratio Eu:Tc an increase in the average luminescence decay time τ from 30 μs to 60 μs was observed. Both complexes can be excited by a 405 nm LED or diode laser. Eu^{3+} in complexes exhibit eight or nine coordination sites.^{1,16} Both $[\text{Eu(Tc)}]$ and $[\text{Eu(Tc)}(\text{HP})]$ complexes display the typical absorption and emission spectra of a lanthanide-ligand complex. The absorption band (with peaks at $\lambda_{\text{exc}} = 398$ and 405 nm) is caused by the presence of the tetracycline ligand which - in its uncomplexed form -

has a very similar absorption spectrum. As in other complexes of this type, the photonic energy absorbed by the ligand is transferred from the triplet state of the ligand to the central Eu^{3+} ion with its typical emission spectrum^{17,18} composed of a main band which sharply peaks at 615 nm (${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_2$) and several side bands centered at 579, 597, 654, and 688 nm (${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_{0-4}$). This reflects the low symmetry of the Eu^{3+} center.

This reversible response in fluorescence emission can be applied in optical sensors for hydrogen peroxide,¹⁹ glucose²⁰, and for the determination of enzyme activities associated with either the production (e.g. by oxidases)²¹ or the consumption of HP (by peroxidase or catalase)^{22,23} using time-resolved fluorescence detection techniques or imaging.

It was reported that the luminescence intensity of Eu^{3+} applied in carboxymethyl cellulose films can be quenched by copper.²⁴ An analogous behavior was observed for europium terpyridyl chelates in solution.²⁵ The quenching method appears suitable for copper determination in environmental or tap water samples, although interferences by other heavy metal ions are immanent. Here, we present a study on the fluorescence quenching of the $[\text{Eu}(\text{Tc})(\text{HP})]$ complex by Cu^{2+} ions and a series of other heavy metal ions. All experimental variables that influence the quenching process have been examined and the associated mechanisms have been analyzed. The parameters were optimized for copper ion determination in microwell plate based assays, which enables a fast and parallel detection of a large number of samples, using time-resolved fluorescence readers or imaging systems.

EXPERIMENTAL

Chemicals and Reagents. All chemicals used were of analytical-reagent grade and reverse-osmosis type quality water (Milli-RO 12 plus Milli-Q station from Millipore) was used throughout. The copper stock solution (1000 mg/L) was prepared from copper(II) sulfate pentahydrate. Stock solutions containing each 1000 mg/L of Fe^{3+} , Ag^+ , Al^{3+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} and Mg^{2+} were prepared from iron(III) chloride hexa-hydrate, silver(I) sulphate, aluminium(III) nitrate nonahydrate, zinc(II) chloride, cobalt(II) chloride hexahydrate, nickel(II) sulfate hexahydrate, manganese(II) sulfate monohydrate, calcium(II) chloride dihydrate and magnesium(II) sulfate heptahydrate, respectively (all from VWR, Darmstadt, Germany). Solutions of lower concentrations were prepared by dilution with a 10 mM MOPS 10 mM buffer of pH 6.9.

The 10 mM MOPS buffer was prepared from 3-(N-morpholino)-propanesulfonic acid and sodium 3-(N-morpholino)propanesulfonate (Carl Roth, Karlsruhe, Germany). A pH of 6.9 was adjusted by addition of a hydrochloric acid solution. The EuTc stock solution was prepared by dissolving the exact amounts of europium(III) chloride hexahydrate (Alfa Products, Danvers, MA, USA; www.alfa.com) and tetracycline hydrochloride (Sigma-Aldrich) in 10 mM MOPS buffer to have a final concentration of 0.21 mmol L⁻¹ in Eu(III) and in Tc.

Apparatus and Software. An Aminco-Bowman Series 2 luminescence spectrophotometer (SLM-Aminco, Rochester, NY) equipped with a continuous wave 150-W xenon lamp as light source was used to acquire steady-state spectra. Fluorescence was excited at 405 nm and the emission collected at 616 nm. All experiments were performed at 25°C.

Luminescence intensities from the 96-microwell plates were recorded with a Tecan GENios Plus microplate reader at an excitation wavelength of 405 nm and an emission wavelength of 612 nm in presence of different metal ion concentrations. The set-up of the imaging system has been described in detail in previous publications^{19,20} and consists of a fast gateable CCD-camera (Imagex – Tgi, Photonic Research Systems, London, GB; www.prsbio.com), a pulseable LED array with 96 UV light emitting diodes (λ_{\max} = 405 nm, Roithner Laser Technik, Vienna; www.roithner-laser.com), optical excitation (BG 12; Schott) and emission filters (KV 550; Schott) and a personal computer for control and visualization of the experiments.

The decay times were recorded with an OB 920 Spectrometer with a μ F 900-HP microsecond flashlamp and a S900 single photon photomultiplier detection system (Edinburgh Instruments Ltd, Livingston, UK; www.edinst.com) using the F900 single photon fluorescence spectrometer software. For the treatment of the experimental data Statgraphics software package (Manugistics Inc. and Statistical Graphics Corporation, USA, 1992), version 6.0 (STSC Inc. Statistical Graphics Corporations, USA, 1993) were used.

Procedure. Aliquots of the aqueous solution containing between 0.2 and 1.6 μ mol L⁻¹ of copper or other metal ions were placed into a 10 mL volumetric flask containing 10 μ mol L⁻¹ of the [Eu(Tc)] complex and 0.4 mmol L⁻¹ of HP. The solution was filled up to 10 mL with a 10 mM MOPS buffer of pH 6.9. Then, 200 μ L of this solution were placed in each well of a 96-well microplate. The fluorescence intensity was measured

after 30 minutes. The time-resolved fluorescence intensity was determined in a micro-plate reader setting an excitation wavelength of 405 nm and an emission wavelength of 612 nm with a delay time of 60 μ s after excitation and an integration time of 40 μ s. All measurements were carried out at 25° C.

Reference Procedure. The photometric method of Cu²⁺ determination based on the chelating agent sodium diethyldithiocarbamate-trihydrate (Merck copper test, VWR International, Darmstadt, Germany) was used.

RESULTS AND DISCUSSION

Theoretical Background

Fluorescence quenching refers to any process which decreases the fluorescence intensity of a sample. A variety of molecular interactions can result in quenching. These include excited state reactions, molecular rearrangements, energy transfer, ground-state complex formation, and collisional quenching.^[26] Collisional or dynamic quenching results from collisional encounters between a fluorophore and a quencher molecule. In the case of static quenching, a complex is formed between the fluorophore and the quencher, which is nonfluorescent. Collisional (“dynamic”) quenching of fluorescence is described by the Stern-Volmer equation:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_q \tau_0 [Q] = 1 + K_D [Q] \quad (\text{eq.1})$$

where F_0 and F are the fluorescence intensities in the absence and presence of quencher, K_q is the bimolecular quenching constant, τ_0 is the lifetime of the fluorophore in the absence of a quencher, and $[Q]$ is the concentration of the quencher. The Stern-Volmer quenching constant is given by $K_q\tau_0$. If quenching is purely dynamic, the Stern-Volmer constant will be represented by K_D . Accordingly, K_D^{-1} represents the quencher concentration at which 50% of the initial intensity is quenched.

Static quenching can also result in a linear Stern-Volmer plot. Static and dynamic quenching can be distinguished by their different dependence on temperature and viscosity, or preferably by lifetime measurements. An important characteristics of collisional quenching is the equivalence of fluorescence intensity (F) and lifetime (τ):

$$\frac{F_0}{F} = \frac{\tau_0}{\tau} \quad (\text{eq. 2})$$

Therefore:

$$\frac{\tau_0}{\tau} = 1 + K_q \tau_0 [Q] = 1 + K_D [Q] \quad (\text{eq. 3})$$

Static quenching does not decrease the lifetime because only those molecules are “seen” that are fluorescent, since the uncomplexed fluorophores still have the unquenched lifetime τ_0 . The dependence of the fluorescence intensity upon quencher concentration for static quenching is:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_s [Q] \quad (\text{eq. 4})$$

The dependence of F_0/F on $[Q]$ is linear and identical to that observed for dynamic quenching except that the quenching constant is now the association constant of the complex.

The measurement of fluorescence lifetimes is the most definite method to distinguish between static and dynamic quenching since in case of static quenching $\tau_0/\tau = 1$. In many instances the fluorophore can be quenched both dynamically and by complex formation with the same quencher. The characteristic feature of Stern-Volmer plots under such circumstances is an upward curvature, concave toward the y-axis. In this case the dependence of the fluorescence intensity upon quencher concentration is:

$$\frac{F_0}{F} = (1 + K_D [Q])(1 + K_s [Q]) \quad (\text{eq. 5})$$

For detailed derivations see the monograph from *Lakowicz*.²⁶

Experimental Parameters

The presence of copper results in fluorescence quenching of the [Eu(Tc)(HP)] complex. The effect is not attributed to a catalytic decomposition of HP. If decomposition takes place, the addition of Cu(II) ions to a [Eu(Tc)(HP)] solution should generate a continuous decrease in fluorescence intensity over time, until the low fluorescence level of [Eu(Tc)] is achieved. This could not be observed in kinetic measurements. The most important experimental parameters that can affect the luminescence quantum yield of the [Eu(Tc)(HP)] complex are the molar ratio between Eu^{3+} and Tc, the concentration of HP, ionic strength, and pH.

In order to optimize the Eu:Tc molar ratio, solutions containing different molar ratios (1:1; 2:1; 3:1 and 4:1) were prepared. Every molar ratio was tested against different concentrations of copper. The highest response was observed at a stoichiometry of

1:1 which therefore was selected for further experiments. The time-resolved microwell plate assay showed the highest response and the best reproducibility using a timelag of 60 μs with an integration time of 40 μs after excitation, which follows the main component of the three-exponential decay profile of [Eu(Tc)(HP)].¹⁵ The reaction time was varied from 20 to 90 min, revealing that the fluorescence decrease due to quenching reached a steady state after 30 min. Variation of the [Eu(Tc)] and HP concentrations resulted in an optimal dynamic range for the quenching assay at an [Eu(Tc)] concentration of 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ and an excess of HP of 0.4 mmol L^{-1} . Addition of different concentrations of sodium chloride between 50 and 1000 mM showed no noticeable influence of the ionic strength on the quenching constants.

In contrast, the effect of pH on the fluorescence of the europium tetracycline complex is very high. The influence of pH from 4 to 10 on the fluorescence properties was studied with [Eu(Tc)], and [Eu(Tc)(HP)] in the absence and in the presence of Cu^{2+} . Figure 1 shows that in all cases a pH around 6.9 indicates the highest changes in fluorescence intensity. Therefore, all further quenching experiments were carried out at pH 6.9.

Figure 1

Luminescence Intensity Studies

The results obtained by luminescence intensity measurements for copper concentrations from 0.0025 to 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$ were used for the calculation of a Stern-Volmer type calibration curve by plotting $(F_0/F-1)$ vs the concentration of Cu^{2+} , (Figure 2). Both dynamic and static quenching mechanisms can be deduced in the presence of copper as indicated by the concave upward curvature.

Figure 2

Luminescence Lifetime Studies

Different quantities of copper were added to a solution containing 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ of the [Eu(Tc)] complex to detect the changes in luminescence lifetime caused by copper quenching. The average lifetimes τ were calculated using a CCD camera-based device, which can image a 96-microwell plate. The instrumental set-up was the same as described by *Liebsch et al.*²⁷ with slight modifications.¹⁹ Imaging according to the Rapid Lifetime Determination technique (RLD) is a straightforward method for the evaluation of luminescence lifetimes. The fluorescence is integrated during two time windows. The

first has a delay time of 0 μs and an integration time of 50 μs , the second a delay time of 50 μs and an integration time of 50 μs after the excitation pulse (pulse length 60 μs).

After subtraction of the dark background images, the final expression to calculate the lifetime is:

$$\tau = \frac{|t_1 - t_2|}{\ln \frac{A_1}{A_2}} \quad (\text{eq. 6})$$

where t_1 is the delay time of the first window and t_2 is the delay time of the second window. A_1 is the integrated signal obtained in the first window; A_2 is the integrated signal obtained in the second window. Equation 6 assumes a monoexponential decay. In case of a multi-exponential decay system like the [Eu(Tc)(HP)] complex it gives only an approximate value of the average decay time. It is important to note that in this case the selection of the detection windows has an influence on the lifetime calculated by means of this model²⁸, taking into account that the integration times of both windows must have the same value.

From the images obtained (Fig. 3a) we calculated the average lifetimes τ_{AV} of the complex in the presence of different concentrations of copper, observing a decrease in luminescence lifetime with increasing copper concentration (Figure 3b).

Figure 3a,b

Figure 4 shows the Stern-Volmer plot, $(\tau_0/\tau_{AV}-1)$ vs Cu^{2+} , where τ_0 is the average lifetime of the [Eu(Tc)(HP)] complex. The slope of the linear function gives the dynamic quenching constant. Based on the fluorescence intensity plot (Fig. 2), one can plot $[(F_0/F - 1)/[\text{Cu}^{2+}]]$ vs $[\text{Cu}^{2+}]$ as shown in Fig. 5. Accordingly, one can calculate the dynamic and static quenching constants. The slope of this plot is $K_D \cdot K_S$ and the intercept is $(K_D + K_S)$, where K_D is the dynamic quenching constant and K_S is the static quenching constant. In our case, $K_D \cdot K_S$ is $3 \cdot 10^{11} \text{ M}^{-1}$ and $K_D + K_S$ is $2 \cdot 10^6$, so for the constants the values $1.63 \cdot 10^5$ and $1.84 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ can be allocated. The slope of the plot $[(\tau_0/\tau)-1]$ vs $[\text{Cu}^{2+}]$ (Fig. 4) is consistent with a K_D of $1.28 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$. Consequently, we assign for $K_S = 1.84 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ and for $K_D = 1.63 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$.

From K_D , the bimolecular quenching constant K_q for the system $\text{Cu(II)}/[\text{Eu(Tc)(HP)}]$ can be calculated using the expression $K_D = K_q \cdot \tau_0$, which gives a K_q of $2.5 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Figure 4,5

We must say that the equations used to calculate the different quenching constants are valid for species following a monoexponential decay model, taking into account that our fluorescent complex follows a three exponential decay model, the values calculated for the different constants are an approximation.

The RLD technique was also applied to study the influence of the ions Fe^{3+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , and Mg^{2+} on the decay time of the $[\text{Eu}(\text{Tc})(\text{HP})]$ complex. However, comparing statistically the different lifetimes respect to the decay time of the $[\text{Eu}(\text{Tc})(\text{HP})]$ complex in absence of metal ion any changes were observed, except for iron and nickel (Table 2).

As confirmation for the average decay times obtained by the RLD imaging set-up, the Time-Correlated Single Photon Counting (TCSPC) technique was applied in presence of Cu^{2+} (Figure 6), Fe^{3+} , Ni^{2+} , and Zn^{2+} . Table 1 shows the characteristics lifetimes of the different exponential terms included in the global 3-exponential decay model and the average lifetime of the entire decay process, their relative contributions (%) are also quoted considered as the relative fluorescence intensities of the different components included in the global process and expressed as a percentage. χ^2 values close to 1 are obtained. χ^2 indicates the goodness of the fit between the theoretical decay model and the experimental data. Lifetime calculations assuming a 2-exponential decay model resulted in higher χ^2 numbers, thus indicating a less accurate fit.

Figure 6, Table 1

Comparing the results obtained for copper by using both RLD and TCSPC techniques, a good agreement can be found. In the case of iron and nickel the RLD imaging is not sensitive enough to detect such small changes in the average lifetime in the complex three-exponential decay model. Fe^{3+} and Ni^{2+} , similar to Cu^{2+} , are both dynamic and static quenchers, while the others ions (Zn^{2+} , Ca^{2+} and Mg^{2+}) are purely static quenchers. The decrease in lifetime is higher for Cu^{2+} than for Fe^{2+} and Ni^{2+} .

Table 2

To calculate the corresponding static and dynamic quenching constants, fluorescence intensities and lifetimes were measured at different metal ions concentrations. In all cases, $[(F_0/F) - 1]$ vs the metal ion concentration was plotted. From the slope of the plots we calculated the constants of static quenching. For dynamic quenchers, as is the case of Fe^{3+} , $[(\tau_0/\tau) - 1]$ vs metal concentration was plotted, where τ_0 is the lifetime of the $[\text{Eu}(\text{Tc})(\text{HP})]$ solution without metal. From the slope of these plots the constants of

dynamic quenching was calculated. In all cases the values for K_S and K_D are lower than those for copper (Table 3). For Zn^{2+} , Ca^{2+} and Mg^{2+} there was no change in lifetime observable with increasing metal ion concentrations, so these can be suggested as purely static quenchers.

Table 3

Former studies on the use of lanthanides as luminescent probes showed that both static and dynamic quenching can occur in the presence of Cu^{2+} , for example in the case of quenching of the luminescence of Eu^{3+} ions retained by ion-exchange in carboxymethyl cellulose membranes²⁴ and in the case of the Eu(III) terpyridine-polyaminopolycarboxylate chelate.²⁵ In both cases this was ascribed to the paramagnetic nature of Cu^{2+} ions. Other metallic ions caused also quenching, although, much weaker than in presence of Cu^{2+} . It should be considered that coloured ions such as Fe^{3+} , Ni^{2+} , Co^{2+} and Cr^{3+} can cause a quenching effect due to the overlapping of their absorption spectrum with some emission bands of Eu^{3+} . In the case of colourless ions such Pb^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} and Hg^{2+} also no significant dynamic quenching was observed^{24,25}. Results obtained by us agree with those of *Kessler*²⁵ and *Arakawa and Akamine*²⁴, which were outlined above, although the dynamic Stern-Volmer constants for Fe^{3+} and Ni^{2+} are higher in case of our complexation system. Additionally, we found that Ca^{2+} and Mg^{2+} act as static quenchers besides Zn^{2+} .

Time-resolved Fluorescent Intensity Assay for Copper Determination

The luminescence quenching of europium chelates is a promising tool for the quantification of copper concentrations in water samples.^{24,25} A quick sample analysis and a high parallelization can be achieved by the application of microwell plates. Two series of standard solutions were prepared for the determination of the calibration curve: the first in the maximum slope area (9 standards, 4 replicates each), with Cu^{2+} concentrations from 0.0025 to 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$, the second in a concentration range where total quenching is observed (5 standards, 4 replicates each), with Cu^{2+} concentrations from 2 to 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Figure 7). The linearity was proved by a lack-of-fit test and the function obtained was $F = -21872 [Cu(II)] + 36488$. The limit of detection (LOD) calculated as $3 \cdot SD(\text{blank})/\text{slope}$ (according to IUPAC²⁹), was 0.2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ of Cu^{2+} (12 $\mu\text{g/L}$). The saturation limit for the quenching assay was calculated from the intersection point of the linear calibration function ($F = -21872 [Cu(II)] + 36488$) and the function independent

of copper concentration (above maximum quenching) ($F = -51.3 [\text{Cu(II)}] + 1862.4$). Accordingly, the dynamic range for copper determination in aqueous solutions covers concentrations from 0.2 to 1.6 $\mu\text{mol L}^{-1} \text{Cu}^{2+}$ (12 to 101 $\mu\text{g L}^{-1}$). Table 4 summarizes the analytical properties of the fluorescence quenching assay, intercept, slope and probability level were calculated using Statgraphics software. The LOD of this method is comparable to the results obtained with an europium terpyridyl complex,²⁵ but the tetracycline ligand, unlike the terpyridyl derivative, can be obtained very easily. The indicator complex is easy to prepare, shows a sufficient fluorescence intensity (with a quantum yield of $\phi = 0.04$),²³ and is excitable at longer wavelengths.

Figure 7, Table4

RLD Assay for Copper Determination

Detection limit and dynamic linear range were also established using RLD technique. In this case five standard solutions were prepared for the determination of the calibration curve (Figure 3b), between copper concentrations from 0.2 to 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ of Cu^{2+} (4 replicates each). The detection limit (calculated as before) was also 0.2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ of Cu^{2+} (12 $\mu\text{g/L}$). But in this case the dynamic linear range was smaller, running from 0.2 to 0.9 $\mu\text{mol L}^{-1}$ of Cu^{2+} (12 to 57 $\mu\text{g L}^{-1}$).

Interference from other metal species

In the following, the influence of another metal ions such as Al^{3+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ag^+ , Mn^{2+} and Fe^{3+} on the fluorescence intensity of $[\text{Eu(Tc)}(\text{HP})]$ was studied and compared with that of Cu^{2+} . In all cases solutions containing 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ $[\text{Eu(Tc)}]$, 0.4 mmol L^{-1} HP and 0.13 mg/L of the corresponding metal ions except for Mg^{2+} (25 mg/L) and Ca^{2+} (100 mg/L), which are usual concentrations for them in water samples, were prepared in a 10 mM MOPS buffer of pH 6.9. The resulting fluorescence intensities were measured by means of a time-resolving microplate reader with a delay time of 60 μs and an integration time of 40 μs .

The results are summarized in Fig. 8. It is evident that the decrease of fluorescence intensity generated by copper is in all cases higher than that for the other metal ions. Al^{3+} , Ag^+ and Mn^{3+} appeared only as very weak interferents (below 10%), whereas ubiquitous ions like Mg^{2+} , Ca^{2+} and Fe^{3+} interfere strongly. In previous papers it was found that anionic species such as citrate and phosphate^{30,31} also interfere very strongly.

Copper assay validation in water samples

In order to assess the method it was applied to actual water samples of diverse provenance (river water, tap water from old copper pipelines and industrial water), representing highly different copper levels. Considering the interferences, the standard addition method was applied in all cases, adding Cu^{2+} in concentrations between 0.2 and $1.5 \mu\text{mol L}^{-1}$ to the standard solutions prepared with different volumes of sample (from 25 to 800 μL), $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ [Eu(Tc)] and 0.4 mmol L^{-1} HP in 10 mM MOPS buffer of pH 6.9. Table 5 shows the results obtained using the time-resolved fluorescence intensity method. These are compared with a photometric reference method from Merck based on the formation of a copper complex with sodium diethyldithiocarbamate as chelating agent. Table 5 also includes the mean values from the three determinations of each sample, standard deviations and the probability value (P_{val}) of the test used for the comparison of the measurements obtained for both methods. As can be seen, the results obtained for both methods are statistically similar. As a result of this studies, the fluorescent copper assay is preferential reliable and reproducible for contaminated wastewater samples with increased copper concentrations, but the LOD of this method is well below the legal value for copper in drinking water in Europe (2 mg L^{-1}). Its advantages include simplicity and rapidity. Only small sample volumes are required and many samples can be analyzed in parallel by making use of a microwell plate-based format.

Table 5

The time-resolved intensity-based fluorescent assay is preferred over the ratiometric RLD assay because its dynamic linear range is higher. On the other side, interferences can be eliminated more efficiently by the internally referenced RLD technique. The problem of interferences may also be limited by using the standard addition method.

Conclusion

The presence of Cu^{2+} ions causes both static and dynamic quenching of the fluorescence of the europium tetracycline hydrogen peroxide complex. The quenching constants have been quantified using the straightforward Rapid Lifetime Determination (RLD) technique. The results have been validated by Time-Correlated Single Photon Counting (TCSPC). Interferences by other metal ions like Fe^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Ca^{2+} and

Mg²⁺ were also studied. Based on the results, we have developed a method for the determination of Cu²⁺ in aqueous samples. Time-resolved fluorescence intensity measurements were applied to prove the assay with real water samples. In combination with the standard addition method increased copper concentrations in wastewater can be determined.

Acknowledgements

C.C.R. is grateful to Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (Grant reference: AP2000-0732) for financial support.

References

1. F. S. Richardson, *Chem. Rev.* **82**, 541-552 (1982).
2. R. W. Horobin, *J. Microscopy* **119**, 345-355 (1980).
3. S. Osman, U. Turpeinen, O. Itkonen, and U.-H. Stenman, *J. Immun. Meth.* **161**, 97-106 (1993).
4. E. Markela, T. H. Stahlberg, and I. Hemmilä, *J. Immun. Meth.* **161**, 1-6 (1993).
5. P. A. Maple, C. S. Jones, and N. J. Andrews, *J. Clin. Pathol.* **54**, 812-815 (2001).
6. N. Weibel, L. J. Charbonniere, M. Guardigli, A. Roda, and R. Ziessel, *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 4888-4896 (2004).
7. I. Hemmilä and V.-M. Mikkala, *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **38**, 441-519 (2001)
8. B. Geoff, *Immunodiagnosics*, 137-158 (1999).
9. P. R. Selvin, *Top. Fluorescence Spectr.* **7**, 177-212 (2003).
10. P.R. Selvin, *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Structure* **31**, 275-302 (2002).
11. J. Chen, and P. R. Selvin, *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 657-660 (2000).
12. F. J. Steemers, W. Verboom, D. N. Reinhoudt, E. B. van der Tol, and J. W. Verhoeven, *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 9408-9414 (1995).
13. C. Yang, L. M. Fu, Y. Wang, J.-P. Zhang, W.-T. Wong, X.-C. Ai, Y.-F. Quiao, B.-S. Zou, and L.-L. Gui, *Angew. Chem. Int. Ed.* **43**, 5010-5013 (2004).
14. L. M. Hirschy, T. F. van Geel, J. D. Winefordner, R. N. Kelly, and S. G. Schulman, *Anal. Chim. Acta* **166**, 207-219 (1984).
15. O. S. Wolfbeis, A. Dürkop, M. Wu, and Z. Lin, *Angew. Chem. Int. Ed.* **41**, 4495-4498 (2002).

16. S. I. Klink, H. Keizer, and F. C. J. M. van Veggel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **39**, 4319-4321 (2000).
17. B. Alpha, J. M. Lehn, and G. Mathis, *Angew. Chem. Int. Ed.* **26**, 266-267 (1987).
18. M. Xiao, and P. Selvin, *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 7067-7073 (2001).
19. M. Schäferling, M. Wu, J. Enderlein, H. Bauer, and O. S. Wolfbeis, *Appl. Spectroscopy* **57**, 1386-1392 (2003).
20. M. Schäferling, M. Wu, and O. S. Wolfbeis, *J. Fluorescence* **14**, 561-568 (2004).
21. M. Wu, Z. Lin, M. Schäferling, A. Dürkop, and O. S. Wolfbeis, *Anal. Biochem.* (2005), in print.
22. Z. Lin, M. Wu, M. Schäferling, and O.S. Wolfbeis, submitted.
23. M. Wu, Z. Lin, and O. S. Wolfbeis, *Anal. Biochem.* **320**, 129-135 (2003).
24. T. Arakawa, and M. Akamine, *Sens. Actuators B* **91**, 252-255 (2003).
25. M. A. Kessler, *Anal. Chim. Acta* **364**, 125-129 (1998).
26. J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy* (2nd Ed.), pp. 237-245, Kluwer Academic/Plenum New York (1999).
27. G. Liebsch, I. Klimant, B. Frank, G. Holst, and O. S. Wolfbeis, *Appl. Spectroscopy* **54**, 548-559 (2000).
28. K. K. Sharman, A. Periasamy, H. Ashworth, J. N. Demas, N.H. Snow, *Anal. Chem.* **71**, 947-952 (1999).
29. IUPAC, *Spectrochimica Acta B*, 33 B, 242 (1978).
30. Z. Lin, M. Wu, M. Schäferling, O. S. Wolfbeis, *Angew. Chem. Int. Ed* **43**, 1735-1738 (2004).
31. O. S. Wolfbeis, M. Schäferling, A. Dürkop, *Microchim. Acta* **143**, 221-227 (2003).

Figure captions

Figure 1. Effect of pH on the luminescence intensity of (a) [Eu(Tc)(HP)]; (b) [Eu(Tc)(HP)] + Cu²⁺; (c) [Eu(Tc)]. The [Eu(Tc)] concentration was 10 μmol L⁻¹, that of

HP concentration: 0.4 mmol L^{-1} , and the Cu^{2+} concentration was $2 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. pH values were adjusted using NaOH and HCl 0.1 M .

Figure 2. Stern-Volmer plot; $[(F_0/F) - 1]$ vs. $[\text{Cu}^{2+}]$ in MOPS buffer of pH 6.9. F_0 is the fluorescence intensity of the initial $[\text{Eu}(\text{Tc})(\text{HP})]$ solution without Cu^{2+} , and F is the fluorescence intensity of the $[\text{Eu}(\text{Tc})(\text{HP})]$ solution in the presence of Cu^{2+} . The error bars demonstrate the standard deviations calculated from four identical solutions.

Figure 3. (a) Rapid Lifetime Image (RLD) of an $[\text{Eu}(\text{Tc})(\text{HP})]$ solution ($c = 10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) in a microwell plate exposed to different concentrations of Cu^{2+} : (A) 0; (B) 0.2; (C) 0.5; (D) 0.75; (E) 1; (F) $5 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ of $\text{Cu}(\text{II})$, columns were triply spotted. First window: delay time $0 \text{ } \mu\text{s}$ and integration time $50 \text{ } \mu\text{s}$; second window: delay time $50 \text{ } \mu\text{s}$ and integration time $50 \text{ } \mu\text{s}$, excitation pulse $60 \text{ } \mu\text{s}$. (b) Average lifetime τ of $[\text{Eu}(\text{Tc})(\text{HP})]$ in solution ($c = 10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) in the presence of different Cu^{2+} concentrations of 0, 0.2, 0.5, 0.75, 1 and $5 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, respectively.

Figure 4. Stern–Volmer plot; $[(\tau_0/\tau) - 1]$ vs. $[\text{Cu}^{2+}]$ in MOPS buffer of pH 6.9. τ_0 is the lifetime of the $[\text{Eu}(\text{Tc})(\text{HP})]$ solution without Cu^{2+} , and τ is the lifetime in the presence of Cu^{2+} . The error bars show the standard deviations.

Figure 5. Calculations of dynamic and static quenching constants for Cu^{2+} from plots of $[(F_0/F) - 1]/[\text{Cu}^{2+}]$ vs. $[\text{Cu}^{2+}]$. F_0 is the fluorescence intensity of the $[\text{Eu}(\text{Tc})(\text{HP})]$ solution without Cu^{2+} , and F is the fluorescence intensity of the $[\text{Eu}(\text{Tc})(\text{HP})]$ solution in presence of Cu^{2+} .

Figure 6. Luminescence decay profiles of the $[\text{Eu}(\text{Tc})(\text{HP})]$ complex in presence and absence of Cu^{2+} . (a) $\text{Eu}(\text{Tc})(\text{HP})$; (b) $\text{Eu}(\text{Tc})(\text{HP}) + \text{Cu}^{2+}$. Concentrations: $40 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ $[\text{Eu}(\text{Tc})]$; 0.4 mmol L^{-1} (HP) and $10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ Cu^{2+} .

Figure 7. Calibration plot for the determination of Cu^{2+} ; fluorescence intensity vs. $[\text{Cu}^{2+}]$ in MOPS buffer of pH 6.9.

Figure 8. Comparison of the response of the [Eu(Tc)(HP)] fluorescence on copper and other metal species. The respective metal ion concentration was 0.13 ppm (w/w), except for $[\text{Mg}^{2+}] = 25 \text{ ppm}$ and $[\text{Ca}^{2+}] = 100 \text{ ppm}$.

Table 1. Lifetime calculations and relative contributions (%) assuming a triple exponential decay model using the TCSPC technique. Average lifetime of the entire decay process (τ) and chi-squared χ^2 .

Sample	τ_1	τ_2	τ_3	(τ)	χ^2
EuTc + HP	5.6 μ s (1 %)	32.6 μ s (86%)	134.3 μ s (13 %)	45.0 μ s	1.261
EuTc + HP + Cu (II)	10.1 μ s (16 %)	26.7 μ s (67%)	81.7 μ s (17 %)	33.3 μ s	1.328
EuTc + HP + Fe (III)	4.6 μ s (1 %)	30.0 μ s (88 %)	112.3 μ s (11 %)	38.6 μ s	1.418
EuTc + HP + Ni (II)	5.0 μ s (2 %)	30.9 μ s (86 %)	107.1 μ s (12 %)	40.0 μ s	1.588
EuTc + HP + Zn (II)	5.1 μ s (2 %)	30.6 μ s (85 %)	114.1 μ s (13 %)	41.1 μ s	1.427

Table 2. Comparison of average lifetime calculations using RLD and TCSPC techniques. Concentrations: 40 μ mol L⁻¹ [Eu(Tc)]; 0.4 mM (HP) and 10 μ molL⁻¹ of metal, except for Ca(II): 2.5 mM and Mg(II): 1.2 mM.

Sample	RLD (τ)	TCSPC (τ)
EuTc + HP	48.2 μ s	45.0 μ s
EuTc + HP + Cu (II)	28.0 μ s	33.3 μ s
EuTc + HP + Fe (III)	44.3 μ s	38.6 μ s
EuTc + HP + Ni (II)	43.7 μ s	40.0 μ s
EuTc + HP + Zn (II)	46.0 μ s	41.1 μ s
EuTc + HP + Ca (II)	46.7 μ s	-
EuTc + HP + Mg (II)	46.3 μ s	-

Table 3. Static (K_S) and dynamic (K_D) quenching constants for Fe (III), Ni (II), Zn (II), Mg (II) and Ca (II).

Metal ion	K_S (M ⁻¹)	K_D (M ⁻¹)
Cu (II)	1.8·10 ⁶	1.6·10 ⁵
Fe (III)	2.7·10 ⁴	2.7·10 ³
Ni (II)	5.4·10 ³	2.0·10 ³
Zn (II)	1.2·10 ³	-
Mg (II)	3.2·10 ²	-
Ca (II)	1.7·10 ²	-

Table 4. Analytical Figures of Merit of the fluorescence quenching assay.

Parameter	Time-resolved Fluorescent Assay	RLD Assay
	Value; S	Value; S
Intercept	36488; 393.6	46.4; 1.4
Slope	-21872; 864.6	$-8.3 \cdot 10^6$; $2.1 \cdot 10^6$
Probability level % (lack-of-fit test)	12.3	5.7
Linear range ($\mu\text{g/L}$)	12 - 101	12 - 57
Detection limit ($\mu\text{g/L}$)	12	12

Table 5. Determination of copper in different types of water using the Merck photometric method as a reference method.

Matrix	Quenching method ($\mu\text{M Cu}$)	S	Reference method (μMCu)	S	P _{val} (%)
Tap water	2.2	0.9	1.36	0.02	17.07
Industrial water	21.2	6.5	21.3	2.0	98.58
River water (<i>Donau, Germany</i>)	0.6	0.4	0.24	0.02	20.73

Three replicate samples in both cases, S = standard deviation, P_{val} = probability value

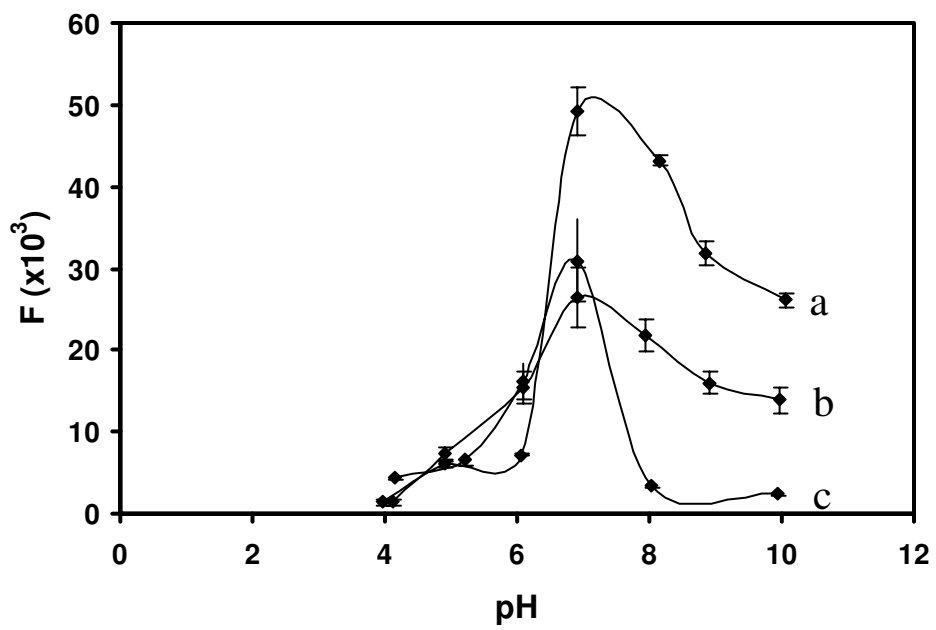


Figure 1

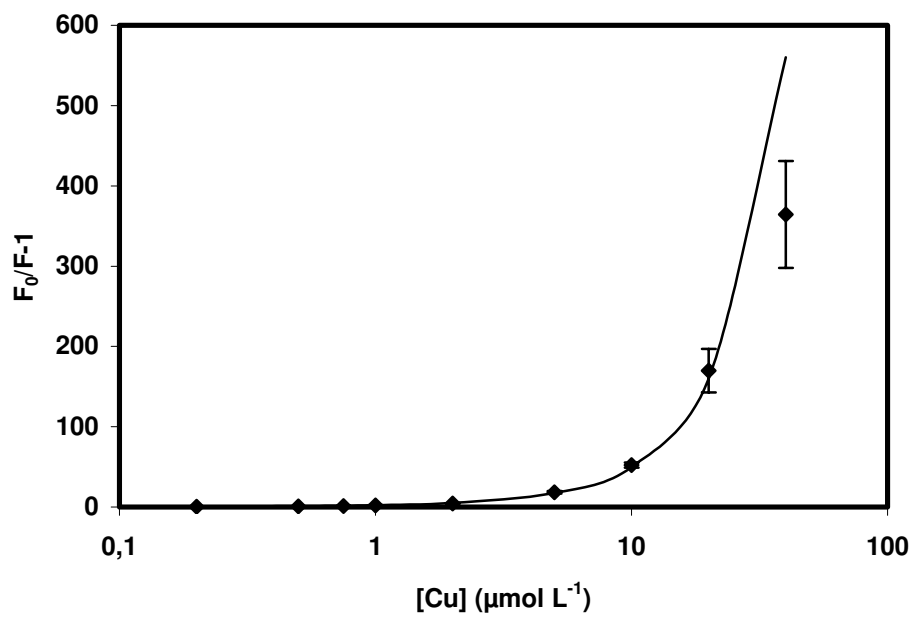


Figure 2

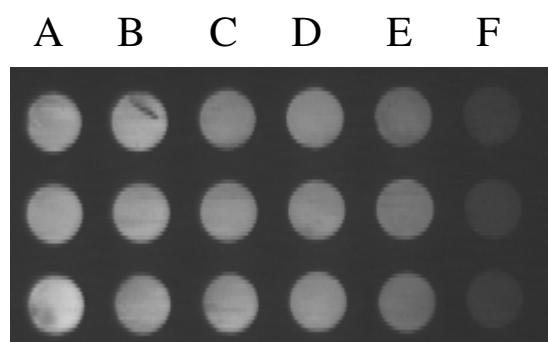


Figure 3a

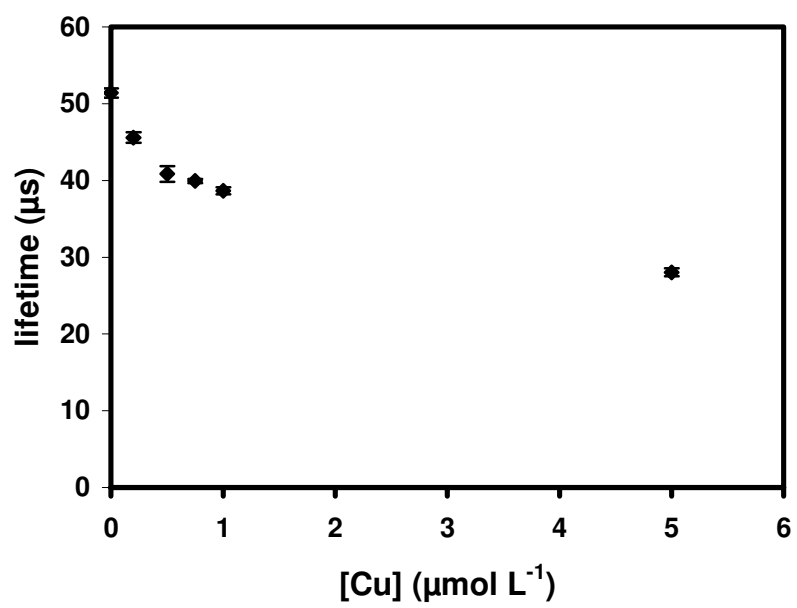


Figure 3b

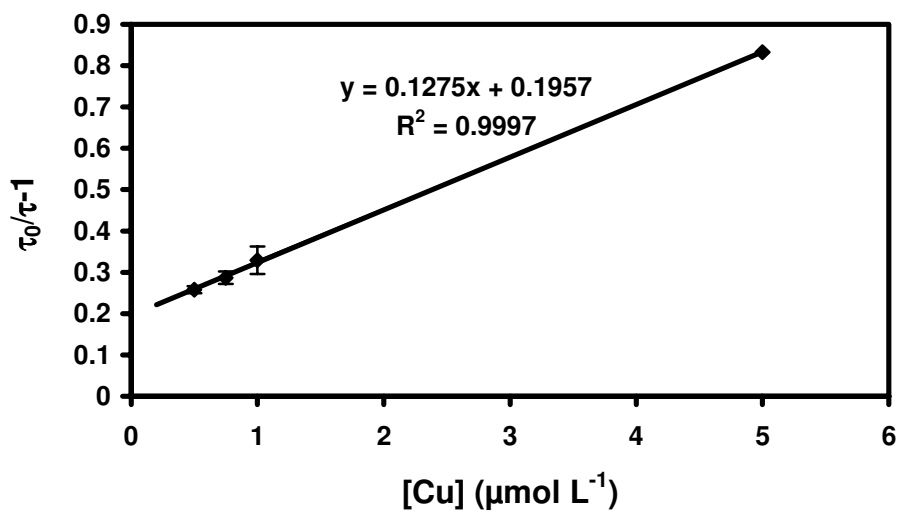


Figure 4

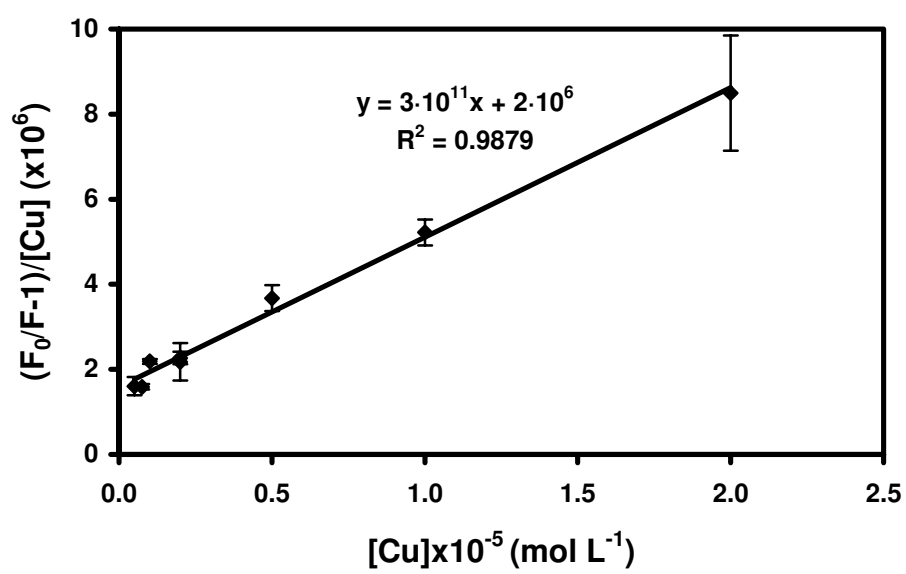


Figure 5

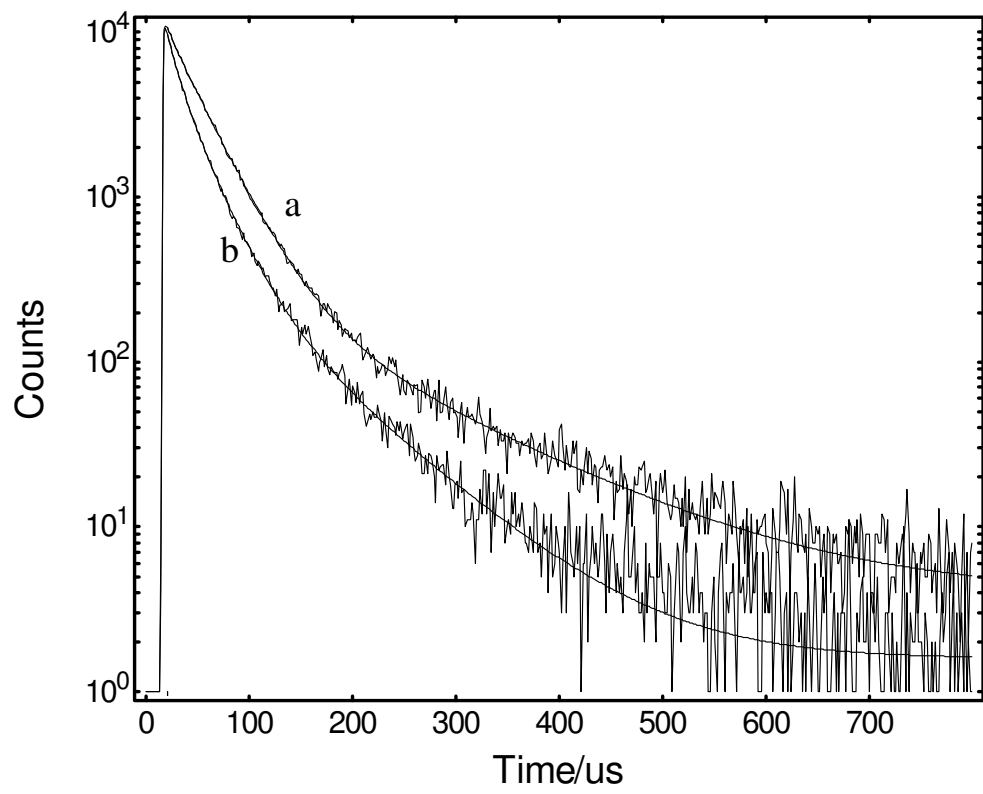


Figure 6

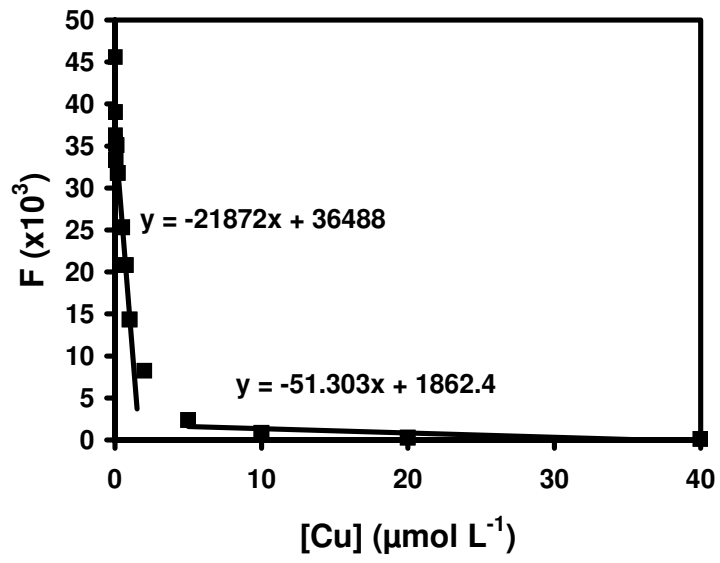


Figure 7

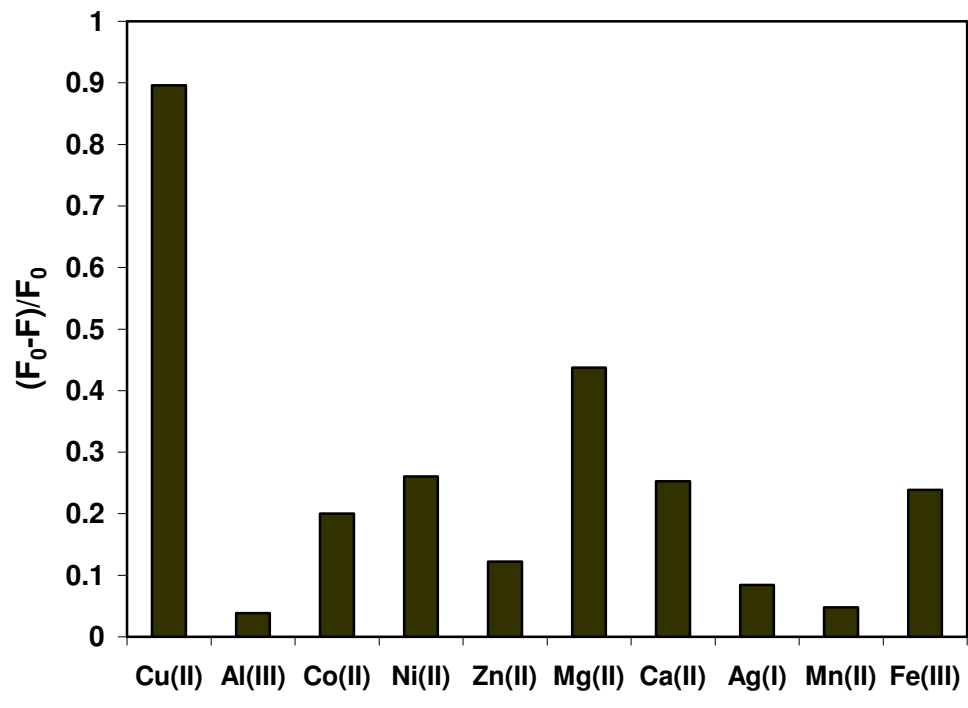


Figure 8