



Universidad de Jaén

AVANCES EN EL ACOPLAMIENTO DE LAS TÉCNICAS DE TRATAMIENTO DE MUESTRA CON EL ANÁLISIS EN FLUJO



Tesis Doctoral

Irene Delgado Blanca

Jaén, 2020



Universidad de Jaén

Escuela de Doctorado

TESIS DOCTORAL

**AVANCES EN EL ACOPLAMIENTO DE LAS TÉCNICAS DE
TRATAMIENTO DE MUESTRA CON EL ANÁLISIS EN FLUJO**

PRESENTADA POR:

IRENE DELGADO BLANCA

DIRIGIDA POR:

DRA. PILAR ORTEGA BARRALES

DR. ANTONIO RUIZ MEDINA

DR. EULOGIO JOSÉ LLORENT MARTÍNEZ

JAÉN, 2020

**AVANCES EN EL ACOPLAMIENTO DE LAS TÉCNICAS DE TRATAMIENTO DE
MUESTRA CON EL ANÁLISIS EN FLUJO**

Los Directores:

Fdo. Dra. Pilar Ortega Barrales

Catedrática

Universidad de Jaén

Fdo. Dr. Antonio Ruiz Medina

Catedrático

Universidad de Jaén

Fdo. Dr. Eulogio J. Llorent Martínez

Profesor Ayudante Doctor

Universidad de Jaén

Memoria de Investigación presentada para aspirar al grado de Doctor en
Química por la Universidad de Jaén.



Fdo. Irene Delgado Blanca

Jaén, 2020

Agradecimientos

Antes de comenzar el desarrollo de esta Memoria de Investigación, quisiera dedicar unas palabras de agradecimiento a todas aquellas personas que han contribuido durante estos años, de forma directa o indirecta, en la realización de esta Tesis Doctoral.

En primer lugar, quiero dar las gracias a mis directores de Tesis Pilar Ortega Barrales, Antonio Ruiz Medina y Eulogio J. Llorent Martínez por darme la oportunidad de llegar hasta aquí. Gracias por acogerme y guiarme durante todos estos años, y por no dejar de creer en mi en ningún momento. Me siento muy orgullosa de haber aprendido de vosotros.

Gracias al Departamento de Química Física y Analítica de la Universidad de Jaén y, en concreto, al grupo de investigación “Innovaciones en Análisis Químico” (FQM 363) por acogerme y brindarme los recursos necesarios para el desarrollo de esta Tesis. En especial quiero dar las gracias a M^a Luisa, Ana, M^a José y Marina, así como a los compañeros del área de Química Física. No sólo habéis demostrado ser grandes compañeros, ayudándome en todo lo que he necesitado, sino que sois como una gran familia de la que me habéis hecho sentir parte.

Gracias también a los compañeros de laboratorio con los que he coincidido a lo largo de este camino. En especial gracias a Julia y Jaime por todos los momentos de risas y confidencias, y por vuestro apoyo en los momentos duros dentro y fuera del laboratorio. Con vosotros me llevo dos grandes amigos.

Gracias a la Fundación Andaltec I+D+i por acogerme durante mi estancia de doctorado, poniendo a mi disposición todos sus recursos y

proporcionándome las muestras necesarias durante la última etapa de esta Tesis. Y gracias a Belén Soriano, que no solo hizo posible dicha estancia, sino que apostó por mi desde el primer día y me brindó la oportunidad de comenzar mi carrera profesional formando parte de su equipo. Me has demostrado en estos años que eres una gran líder y una mejor amiga; pero sobre todo, una bellísima persona.

También quiero agradecer a mi familia, y en especial a mis padres Antonio y Angustias. Me habéis enseñado siempre a luchar por lo que quiero y habéis creído siempre en mi. Gracias por vuestro esfuerzo, amor y dedicación para que me convierta en lo que hoy soy. Gracias a mis hermanos Antonio, Mari y Rocío; en parte si hoy estoy aquí es también por vosotros. Siempre estáis ahí cuando os necesito y sois para mi un ejemplo a seguir. Gracias también a mis sobrinos. Aunque aún no sean conscientes de ello, son el pilar de mi vida. Ellos dan luz y alegría a mis días. Me siento infinitamente orgullosa de todos vosotros.

Gracias a Manuel, por apoyarme siempre y animarme en los malos momentos, y por no permitirme abandonar nunca. No sólo ves siempre lo mejor de mi, sino que me ayudas a confiar en mi misma y me impulsas a mejorar cada día. Gracias por acompañarme en esta andadura... nuestro camino apenas comienza.

Dicen que cada persona es el promedio de aquellos que le rodean, y yo tengo la suerte de llevar conmigo un pedacito de cada uno de vosotros. Gracias a todos.

A mis padres

A mis hermanos

A mis sobrinos

“Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas”

Marie Curie (1867-1934)

ÍNDICE

Índice

RESUMEN	17
1. Resumen	19
2. Justificación y objetivos	25
3. Introducción	31
3.1 Sistemas automáticos de análisis	32
3.1.1. Análisis por inyección secuencial (SIA)	42
3.1.2. Análisis por inyección en flujo multijeringa (MSFIA)	52
3.1.3. Sistemas de detección	62
3.2. Automatización del tratamiento de muestra	71
3.2.1. Extracción líquido-líquido (LLE)	73
3.2.2. Extracción en fase sólida (SPE)	90
3.3. Optosensores en flujo continuo	105
3.3.1. Propiedades de los optosensores en flujo continuo	106
3.3.2. Componentes de los optosensores en flujo continuo	108
3.3.4. Clasificación de los optosensores en función del número de analitos	113
3.4. Desarrollo de métodos automáticos: automatización de variables	115
3.4.1. Variables del sistema de flujo	117
3.4.2. Variables instrumentales del detector	118
3.4.3. Variables químicas	119
3.5. Los analitos y su determinación	127

3.5.1. Vitaminas	127
3.5.2. Pesticidas	132
3.5.3. Aditivos plásticos	138
4. Resultados y discusión	145
5. Conclusiones	262
6. Bibliografía.....	267
Anexo 1: Contribuciones científicas derivadas de esta Memoria.....	311
Anexo 2: Acrónimos y abreviaturas	314

RESUMEN

1. Resumen

Esta Memoria de Investigación recoge una serie de aportaciones científicas en el campo del análisis en flujo automatizado. Se han desarrollado diferentes optosensores en los que se hace uso del análisis por inyección secuencial (SIA) y el análisis por inyección en flujo multijeringa (MSFIA). Ambas metodologías han sido acopladas a la detección espectrofluorimétrica (ya sea mediante fluorescencia nativa o mediante derivatización química), siendo aplicadas a la determinación de analitos de interés en el sector farmacológico y agroalimentario.

En concreto, se han desarrollado cuatro metodologías analíticas en las que se han incluido la automatización de una o varias etapas de tratamiento de muestra. En función de las técnicas de tratamiento de muestra automatizadas, los trabajos aquí presentados pueden clasificarse en dos grupos:

- Mejora de los optosensores multiparamétricos, como una forma de automatizar la extracción en fase sólida (SPE).
- Automatización de la extracción líquido-líquido (LLE).

En el caso de los optosensores multiparamétricos, se han desarrollado sensores capaces de separar hasta cuatro analitos mediante la combinación de dos factores: el uso de una cantidad adicional de soporte sólido en la célula de flujo y la optimización de las disoluciones de elución. De este modo, se simplifica una de las formas más comunes de automatizar la SPE, en la que se emplean minicolumnas rellenas de un material adsorbente adecuado para separar, concentrar y/o purificar los analitos. Los optosensores

multiparamétricos desarrollados han sido aplicados al análisis de pesticidas en frutas de diversa naturaleza y, si bien no suplen a los métodos cromatográficos en este campo, sí han demostrado su utilidad en el análisis de rutina de aplicaciones concretas que requieren la determinación de pocos analitos y como métodos de screening para determinar pesticidas en alimentos.

En cuanto a la automatización de la LLE, esta ha sido aplicada a la extracción de compuestos orgánicos en matrices acuosas y oleosas. Para la extracción en matrices acuosas se ha utilizado un sistema SIA con dos jeringas independientes, con el objetivo de separar los canales por los que circulan el extractante orgánico del resto de disoluciones empleadas. Como resultado, se consigue un sistema más simple que los descritos anteriormente, mucho más complejos y con un mayor requerimiento de instrumentación y, por tanto, más costosos. El sistema ha sido aplicado con éxito al análisis de la vitamina B1 en preparados farmacéuticos.

La LLE en matrices oleosas se llevó a cabo mediante un sistema MSFIA equipado con cuatro jeringas y dos válvulas independientes (una válvula multiposición y una válvula de selección). El método desarrollado supone un avance para la automatización de la LLE, ya que hasta la fecha no se habían descrito trabajos en este campo aplicados a muestras de carácter oleoso. El sistema desarrollado se aplicó a la extracción y determinación de 4,4'-hidroxibifenilo en muestras de aceite de oliva procedentes del contacto con materiales plásticos, demostrando ser una alternativa a la LLE manual empleada en los

ensayos de migración de aditivos plásticos a los que han de someterse estos materiales en laboratorios de rutina.

Todos los métodos desarrollados se han sometido a la optimización de las variables experimentales adecuadas: variables instrumentales, variables químicas, variables del sistema de flujo o variables de la unidad de retención o extracción, según proceda. Además, se validaron cada uno de los sistemas propuestos mediante métodos de referencia cromatográficos, obteniendo en todos los casos parámetros analíticos adecuados.

A continuación, se enumeran los trabajos recogidos en esta Memoria de Investigación:

1. Separación de una mezcla binaria de pesticidas en frutas usando un optosensor en flujo continuo.
2. Novedosa separación y determinación secuencial de una mezcla cuaternaria de fungicidas usando un optosensor fluorimétrico automatizado.
3. Un nuevo enfoque para la extracción líquido-líquido automatizada en un sistema de inyección secuencial.
4. Extracción líquido-líquido automatizada en un sistema de análisis en flujo multijeringa para estudios de migración en materiales de contacto alimentario: análisis de 4,4'-dihidroxibifenilo.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

2. Justificación y objetivos

La Química Analítica se enfrenta a una evolución constante que responde a las demandas crecientes de la sociedad actual, la cual requiere de la creación y mejora de nuevos métodos analíticos que aporten soluciones para el análisis de nuevos compuestos de interés y/o de concentraciones cada vez inferiores, y que presenten una mayor exactitud y precisión de las medidas a la par que reduzcan los tiempos y costes del análisis. Uno de los aspectos clave en esta evolución lo constituyen los Métodos Automáticos de Análisis, que en las últimas décadas han cobrado un inusitado interés que se ha concretado en el desarrollo de muchos y variados instrumentos ampliamente comercializados en un gran número de disciplinas (análisis clínico, medioambiental, agroalimentario, control de calidad, etc.).

El desarrollo de estos métodos surgió de la necesidad de llevar a cabo ensayos analíticos con un menor coste de material y tiempo, a la vez que disminuye la participación humana, con la ventaja que ello implica de mayor simplicidad, mejora en la productividad, así como disminución de errores y riesgos para el operador y para el medio ambiente. Particularmente, uno de los grandes retos dentro de los métodos automáticos de análisis es el de la inclusión de las diferentes técnicas de tratamiento de muestra, buscando siempre la minimización o incluso eliminación de la participación humana en el análisis. En este sentido, las técnicas de análisis en flujo han demostrado ser una de las herramientas más adecuadas para la manipulación automatizada de muestras y reactivos, gracias a su versatilidad.

La presente Memoria, titulada “Avances en el acoplamiento de las técnicas de tratamiento de muestra con el análisis en flujo”, se enmarca dentro de una de las líneas de investigación desarrolladas por el Grupo de Investigación “Innovaciones en el Análisis Químico” (Grupo FQM 363 del Plan Andaluz de Investigación (PAI)). Uno de los objetivos actuales de esta línea es el desarrollo de nuevas metodologías de análisis por inyección en flujo con detección espectroscópica que incorporen etapas de tratamiento de muestra *online*, así como su aplicación a la determinación de analitos de interés en distintos campos, como son el farmacológico, el agroalimentario o el medioambiental.

Esta Memoria de Investigación tiene como objetivo general contribuir a la mejora de los métodos automatizados de análisis en flujo, especialmente en lo que se refiere a la incorporación de procedimientos de tratamiento de muestra en el mismo sistema de flujo. En este sentido, se pretende desarrollar métodos analíticos sencillos que consigan reducir el consumo de reactivos, el tiempo empleado en los análisis y, por lo tanto, el coste de los mismos, todos ellos objetivos de la Química Verde, a la vez que mantengan los niveles requeridos en cuanto a sensibilidad, selectividad y reproducibilidad, de modo que representen una alternativa real a los métodos convencionales empleados y requeridos por los diferentes campos de la industria.

Este objetivo se llevará a cabo por medio de las siguientes vías:

- Desarrollar nuevos y mejorados optosensores multiparamétricos en sistemas SIA que permitan la separación de mezclas de analitos más complejas de lo conseguido hasta la fecha, sin necesidad de incorporar elementos extra en el sistema (minicolumnas o columnas monolíticas), que permitirán llevar a cabo la separación y/o limpieza de los mismos dentro del sistema de flujo (SPE automatizada).
- Introducir mejoras en el empleo de la LLE de forma automatizada utilizando un sistema SIA convencional con una sola válvula multiposición.
- Aplicar la LLE automatizada a muestras de carácter oleoso mediante el uso de un sistema multijeringa equipado con una válvula multiposición y una válvula de inyección.

INTRODUCCIÓN

3. Introducción

En este capítulo se presenta un resumen de la evolución de los sistemas automáticos de análisis en flujo, profundizando en aquellos que han sido empleados en el desarrollo de esta Tesis Doctoral: SIA y MSFIA. Así mismo, se recogen los principios básicos y aplicaciones relacionadas con la incorporación de las técnicas de tratamiento de muestra en sistemas automatizados, particularmente la LLE y la SPE, entre los que se incluyen los optosensores en flujo continuo. Por último, se exponen las variables experimentales que se han tenido en cuenta para la optimización de los métodos analíticos desarrollados, así como una breve descripción de los analitos seleccionados y sus métodos de análisis.

3.1. Sistemas automáticos de análisis

Los sistemas automáticos de análisis surgen en la segunda mitad del siglo XX de la necesidad de desarrollar métodos de análisis más rápidos y eficientes, capaces de satisfacer la alta demanda de controles aplicados a los diferentes campos de la industria agroalimentaria, el sector clínico y farmacéutico, la industria química o los diferentes campos de investigación. Estos sistemas, en comparación con los métodos convencionales, permiten una menor intervención del operador y dan lugar a métodos analíticos más robustos y precisos, caracterizados por una elevada frecuencia de muestreo. Además, destacan por permitir su miniaturización, minimizando el consumo de reactivos y muestras y generando, por tanto, una menor cantidad de residuos y siendo más respetuosos con el medio ambiente.

Los métodos automáticos de análisis se clasifican en dos tipos, en función del modo de procesamiento de la muestra:

- *Sistemas discontinuos*

En estos sistemas la muestra se mantiene todo el tiempo en un recipiente independiente en el cual ocurren las diferentes etapas analíticas, desde su dilución o adición de reactivos, agitación, calentamiento, etc. hasta su detección y cuantificación mediante la obtención de una señal analítica puntual. El recipiente que contiene la muestra es transportado mecánicamente por las diferentes etapas del sistema de forma secuencial, tal y como se muestra en la Figura 1.

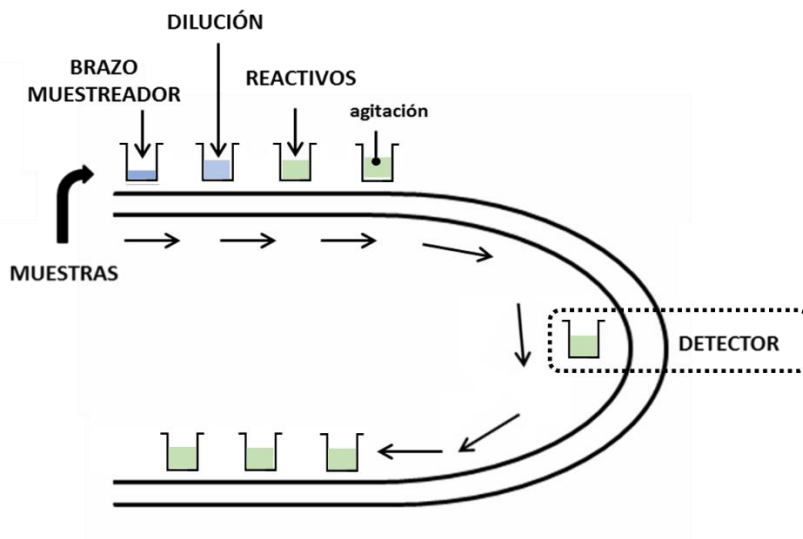


Figura 1. Esquema general de un sistema automático discontinuo.

- *Sistemas continuos*

En estos sistemas, también denominados sistemas de análisis en flujo, la muestra es insertada en el flujo de un líquido o un gas sin interrumpir el mismo. Dicho flujo circula por canales adecuados a través del sistema, transportando la muestra hasta el detector, en el cual se registra la señal analítica de forma continua. En el camino al detector, el canal por el que circula la muestra puede confluir con otros canales adicionales por los que pueden circular reactivos, disolventes, disoluciones tampón, etc. en función de la necesidad de llevar a cabo reacciones de derivatización, diluciones o cualquier otra operación preparativa. A su paso por el detector, el analito produce un efecto transitorio en la señal analítica que se traduce en la aparición de un pico, cuya altura y área es proporcional a la concentración del mismo.

Los primeros sistemas de análisis en flujo desarrollados fueron el Análisis por Flujo Segmentado (SFA, *Segmented Flow Analysis*) [1] y el Análisis por Inyección en Flujo (FIA, *Flow Injection Analysis*) [2]. Ambos tipos constituyen la denominada primera generación de los sistemas continuos de flujo, y se caracterizan por ser sistemas controlados de forma manual.

Un sistema SFA [3–5] utiliza una bomba peristáltica como medio de propulsión de las disoluciones en el sistema. Las muestras son aspiradas secuencialmente, insertando burbujas de aire entre ellas, impidiendo la contaminación entre muestras y su dispersión, a la par que favorecen la mezcla entre muestra y reactivos (en caso de ser necesarios) durante el camino al detector, alcanzándose el equilibrio físico-químico antes de la obtención de la señal analítica. Debido a que la muestra no sufre dispersión a su paso por el sistema, el perfil de la señal obtenida es prácticamente rectangular. La Figura 2 muestra un sistema de este tipo.

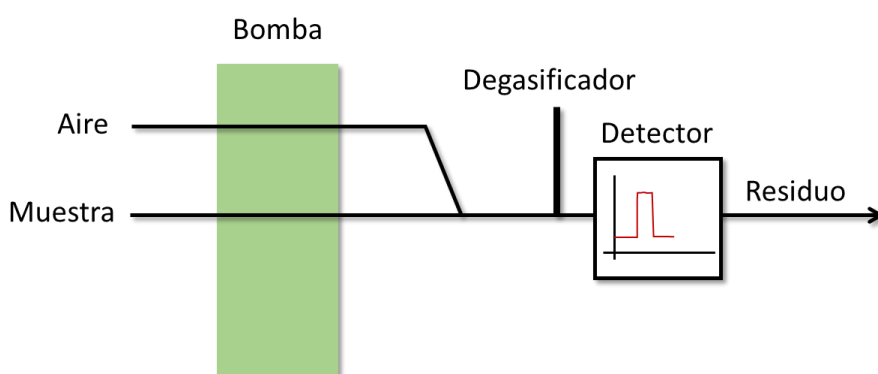


Figura 2. Esquema general de un sistema SFA.

Inspirados en estos sistemas SFA surgen los sistemas FIA [6–9], los cuales incorporan una válvula de inyección que permite la inserción de una cantidad conocida de muestra en el flujo portador. Difieren de sus antecesores en que no se introducen burbujas en el sistema y no se consigue alcanzar el equilibrio físico-químico antes de la detección, con lo cual estos sistemas precisan de un mayor control del tiempo que permanece la muestra en el sistema para obtener señales intensas y reproducibles. Estos sistemas presentan la ventaja de ser más simples y fáciles de manejar, además de que permiten análisis más rápidos con volúmenes de muestra mucho menores a los requeridos por los sistemas SFA. La Figura 3 muestra un sistema FIA básico.

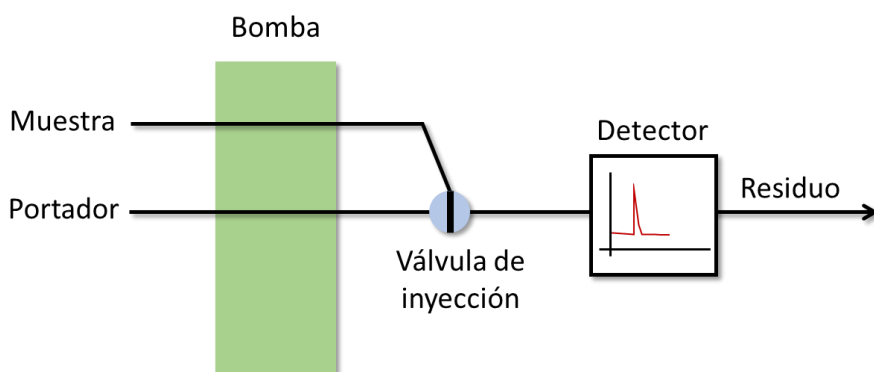


Figura 3. Esquema general de un sistema FIA.

Con la irrupción de la era digital en los laboratorios en las últimas décadas del siglo XX, los sistemas de análisis en flujo evolucionaron hacia los conocidos como sistemas de segunda generación, los cuales podían ser controlados por ordenador. De este modo aparecen en la década de los noventa nuevas técnicas como el Análisis por Inyección Secuencial (SIA, *Sequential Injection Analysis*) [10], el Análisis por

Inyección en Flujo Multiconmutado (MCFIA, *Multiconmuted Flow Injection Analysis*) [11], el Análisis por Inyección en Flujo Multijeringa (MSFIA, *Multisyringe Flow Injection Analysis*) [12] o los Sistemas en Flujo Multibombas (MPFS, *Multipumping Flow Injection Analysis*) [13].

Los sistemas SIA [14–21] son los primeros en sustituir la bomba peristáltica como medio de propulsión, empleando en su lugar bombas de pistón constituidas por jeringas de vidrio bidireccionales. Además, introduce una válvula de selección en lugar de la clásica válvula de inyección de los sistemas FIA, aportando al sistema una mayor versatilidad al permitir la introducción de módulos y reactores auxiliares. Este tipo de sistemas se describirán con mayor profundidad más adelante, debido a que se trata de uno de los empleados en los trabajos desarrollados en esta Tesis Doctoral.

Los sistemas MCFIA [22–26] suponen una evolución de los sistemas FIA convencionales. Estos sistemas incorporan válvulas de conmutación rápida, habitualmente válvulas solenoides de tres vías, dotan al sistema de una mayor versatilidad y permiten una mayor miniaturización y automatización del sistema. Estas válvulas permiten la recirculación del flujo de muestra y/o reactivos hacia sus reservorios, así como seleccionar el momento y la cantidad de cada disolución que se quiere enviar al sistema por medio del control de los tiempos en los que las válvulas están activas, permitiendo así una considerable reducción en el consumo de muestra y reactivos y en la generación de residuos con respecto a los sistemas FIA clásicos. La Figura 4 muestra un ejemplo de un sistema MCFIA.

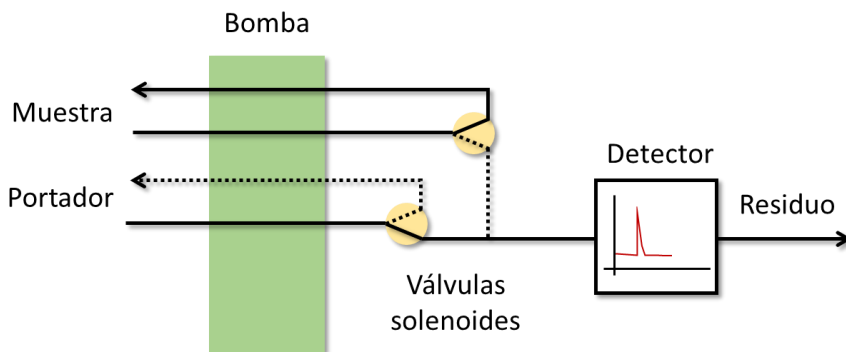


Figura 4. Esquema general de un sistema MCFIA.

Posteriormente aparecieron los sistemas MSFIA [27–30], los cuales combinan aspectos de los sistemas SIA y MCFIA. Estos sistemas se basan en la utilización de una multibureta para impulsar el flujo, equipada con varias jeringas encabezadas por válvulas solenoides de tres vías y propulsadas por un mismo motor. Suelen ir acompañadas por válvulas adicionales (tanto de selección como de inyección o válvulas solenoides de tres vías) que hacen de estos sistemas uno de los más versátiles. Junto con el SIA, este tipo de sistemas fue empleado en el desarrollo de esta Tesis, por lo que profundizaremos en sus características más adelante.

Los sistemas MPFS [31–33] aparecen en el siglo XXI. Están basados en el uso de microbombas solenoides de pistón que actúan como medio impulsor del flujo y que operan de forma independiente, de modo que son los únicos componentes activos en el sistema (aunque pueden usarse en combinación con válvulas solenoides). Esto posibilita su miniaturización y portabilidad, haciéndolos ideales para medidas *in situ*. Estas bombas tienen un volumen prefijado de unos pocos microlitros (entre 8 y 50 μL) que aspiran cuando son activadas y liberan

en el sentido del flujo cuando son desactivadas, generando así un flujo pulsado que permite una mejor homogenización en las zonas de reacción, dando lugar a señales más intensas. Estos sistemas son más simples y rápidos, y permiten minimizar el consumo de reactivos y muestras, aunque presentan algunos problemas como la posibilidad de bloquearse ante la entrada de pequeñas partículas en el sistema o su predisposición a descalibrarse ante sobrepresiones en el flujo. La Figura 5 muestra un sistema de este tipo.

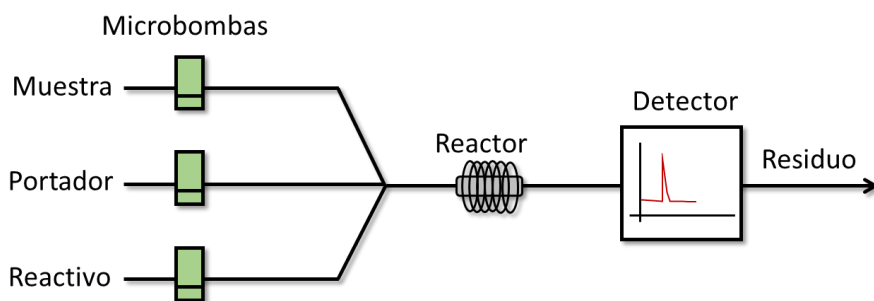


Figura 5. Esquema general de un sistema MPFS.

Aunque los sistemas como MCFIA, SIA y MSFIA continúan en auge hoy día, existen otros sistemas emergentes centrados en la miniaturización del sistema que constituyen la conocida como tercera generación de sistemas de análisis en flujo. Éstos surgen en el año 2000 cuando Ruzicka introdujo los sistemas *Lab-On-Valve* (LOV) [34]. Este sistema se basa en el uso de una válvula de selección modificada y diseñada para integrar los diferentes elementos que componen un sistema convencional: cámaras de reacción [35], sistemas de extracción en fase sólida [36,37], detectores [38], etc. Este sistema es implementado normalmente en un sistema SIA compacto, aumentando

la miniaturización del sistema, en el cual se manejan volúmenes de unos pocos microlitros.

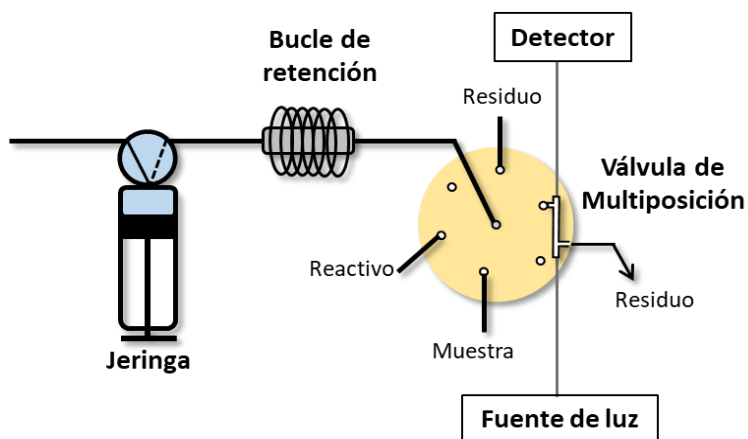


Figura 6. Esquema general de un sistema Lab-On-Valve.

Ya en la presente década están surgiendo nuevos sistemas explotados en menor medida: el Análisis por Inyección Simultánea-Mezcla Efectiva (SIEMA, “*Simultaneous Injection-Effective Mixing Analysis*”) [39] y el Análisis por Inyección Cruzada (CIA, “*Cross Injection Analysis*”) [40], los cuales surgen de la combinación de elementos de sistemas anteriores; mientras que los sistemas *Lab-in-Syringe* (LIS) [41] suponen una simplificación de los mismos.

Los sistemas SIEMA [42,43] pueden considerarse como un híbrido entre FIA, SIA y los sistemas multiconmutados. Un sistema de este tipo puede observarse en la Figura 7. Utilizan una jeringa propia del SIA como medio de propulsión, la cual se encarga de aspirar reactivos y muestra a la vez por medio del uso de válvulas solenoides de tres vías independientes hacia sus respectivos bucles de retención

(bucles 1 a 3), para después impulsarlos hacia el bucle de reacción (bucle 4) y, finalmente, al detector.

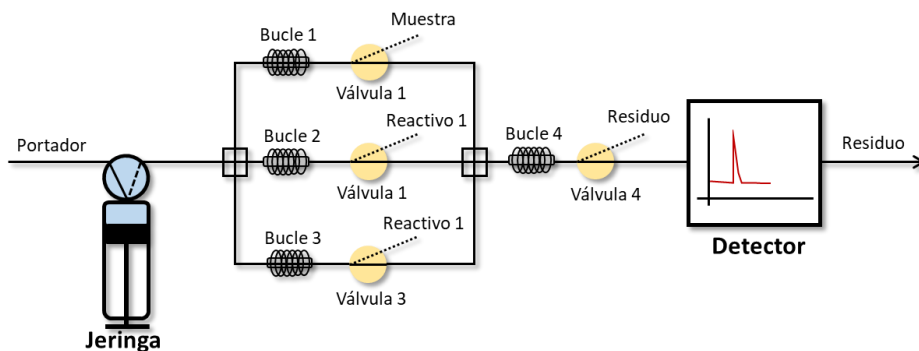


Figura 7. Esquema general de un sistema SIEMA.

Los sistemas CIA [44,45] por su parte emplean dos bombas peristálticas para impulsar dos flujos que confluyen perpendicularmente a través de un bloque rectangular acrílico en el que se han perforado los canales por los que circula el flujo: un canal principal por el que circula el flujo portador (eje X) y varios canales perpendiculares (generalmente 4) por los que circulan reactivos y muestra (eje Y). Un sistema de este tipo puede observarse en la Figura 8. Las bombas pueden operar de forma alterna, de modo que la bomba que impulsa el portador se detiene mientras se cargan muestras y reactivos a través de la otra bomba, para posteriormente arrastrar con el flujo portador la cantidad que queda en las intersecciones de ambos ejes (se emplean, por lo tanto, volúmenes muy pequeños de muestra y reactivos). Sin embargo, las bombas también pueden operar simultáneamente, arrastrando volúmenes más grandes de muestra y reactivos hacia el detector.

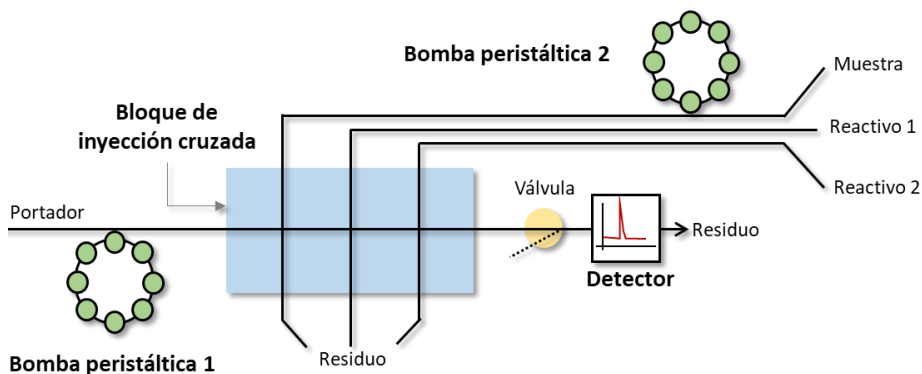


Figura 8. Esquema general de un sistema CIA.

En cuanto a los sistemas LIS [46], se caracterizan por llevar a cabo varias etapas del procedimiento analítico dentro de una jeringa o bomba de pistón, como la LLE dispersiva [47,48] o la extracción de volátiles en espacio de cabeza empleando una gota de disolvente extractor [49], así como la detección luminiscente de los analitos [50]. Esto hace de estos sistemas uno de los más simples y compactos.

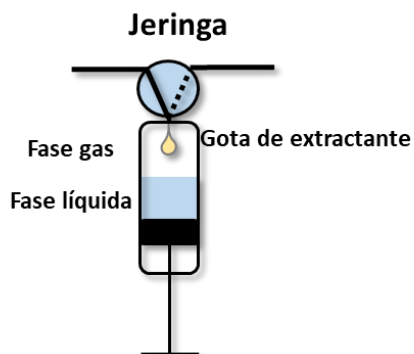


Figura 9. Esquema de la jeringa de un sistema *Lab-In-Syringe* con microextracción de espacio de cabeza.

3.1.1. Análisis por inyección secuencial (SIA)

El SIA es una técnica de análisis continuo o en flujo no segmentado introducida por primera vez en 1990 por Ruzicka y Marshall [10], destacando frente a sus antecesores por ser un sistema controlado a través de un ordenador. Esto supuso una gran innovación en el laboratorio, dando lugar a lo que se conoce como segunda generación de sistemas de análisis en flujo.

La Figura 10 muestra la configuración típica de un sistema SIA, cuyos componentes principales detallaremos a continuación (excepto los sistemas de detección, los cuales se exponen más adelante).

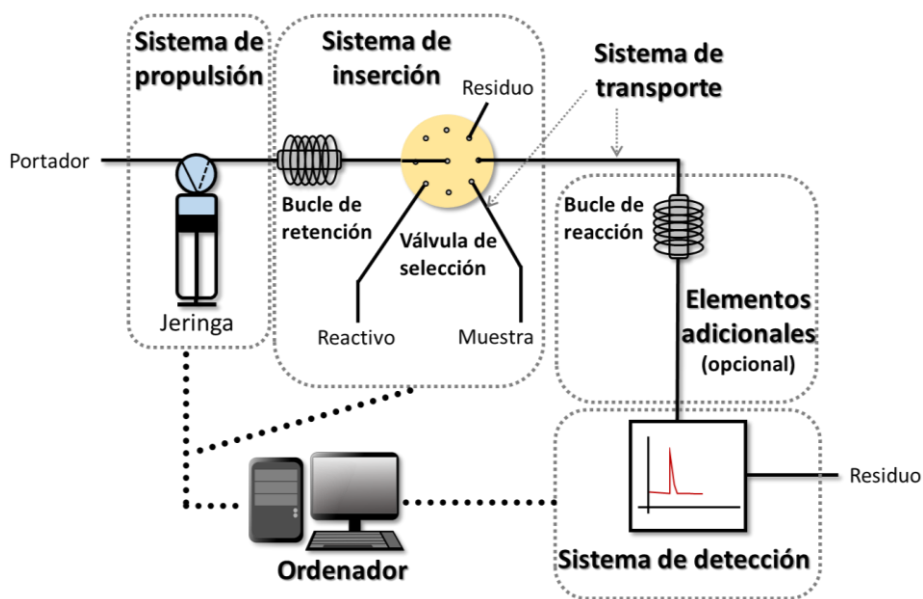


Figura 10. Esquema general de los componentes de un sistema SIA.

Sistema de propulsión

Un medio de propulsión adecuado para los sistemas SIA debe de proporcionar un flujo estable y libre de pulsos, así como permitir el control a través de un ordenador tanto de la velocidad de flujo como del sentido del mismo. El sistema SIA inicialmente propuesto por Ruzicka y Marshall [10,51,52] empleaba una bomba de pistón sinusoidal con una sola posible dirección a su salida que movía el líquido en el sistema a través de pasos hacia atrás o hacia delante. Sin embargo, también se llevaron a cabo pruebas con bombas peristálticas tipo FIA [53], las cuales crean el flujo mediante la presión ejercida por unos rodillos sobre tubos de plástico flexibles, haciendo pasar continuamente el flujo portador hacia el sistema. Estas tienen la ventaja de permitir mayor frecuencia de muestreo frente a las bombas de pistón, que precisan ser rellenadas periódicamente, además de que las bombas peristálticas eran más comunes en los laboratorios de la época.

Sin embargo, las bombas peristálticas presentan otras desventajas frente a las bombas de pistón, como la corta vida útil asociada a los tubos flexibles que emplean, además de su baja compatibilidad química con algunos disolventes y soluciones ácidas. Como alternativa, se propuso sustituir estos medios de propulsión por una autobureta [54], la cual se puede describir como una bomba de pistón que incorpora su propia válvula de dos posiciones a la cabeza que se conecta en una posición con el reservorio de la disolución portadora o *carrier*, y en la otra posición con la válvula multiposición. Este tipo de bomba es más fácil de manejar y permite configuraciones más sencillas, además de ser más comunes en los laboratorios que las bombas

sinusoidales, por lo que rápidamente se impusieron como el sistema de propulsión preferido en SIA, siendo el más utilizado en los equipos SIA comerciales.

Las Figuras 11 y 12 muestran, respectivamente, una comparativa esquemática de los tres tipos de bomba mencionados y una imagen del sistema comercial empleado en la presente Tesis Doctoral.

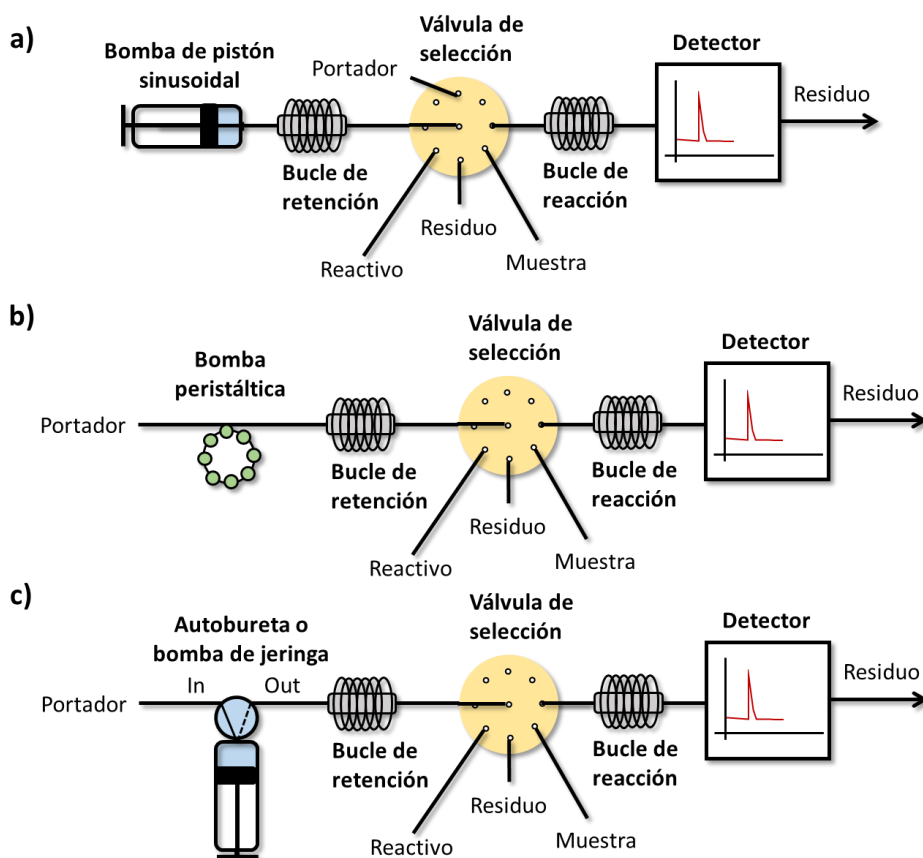


Figura 11. Comparativa de la configuración de un sistema SIA usando tres tipos de bomba diferentes: a) configuración con bomba sinusoidal; b) configuración con bomba peristáltica; c) configuración con autobureta o bomba de jeringa con dos posiciones (“In” para la entrada de portador y “Out” para la conexión al sistema).

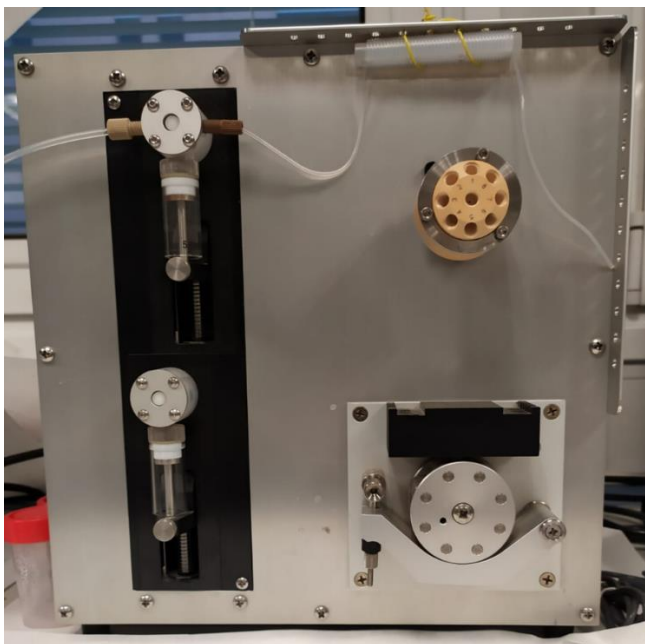


Figura 12. Fotografía del sistema SIA empleado, provisto de dos bombas de jeringa independientes, una bomba peristáltica y una válvula multiposición de 8 vías.

Sistema de transporte

Cualquier sistema de análisis en flujo precisa de un sistema de tubos y conexiones que unan los diferentes elementos entre sí y sirvan como medio de conducción para las diferentes disoluciones en el sistema. Éstos deben tener un diámetro interno constante (generalmente entre 0.2 y 12 mm) para controlar los volúmenes que circulan en su interior. Esto es especialmente importante en los sistemas FIA, ya que el manejo de los volúmenes se realiza en función de los tiempos de operación, la velocidad de flujo y las dimensiones de los tubos. Deben ser estables a las condiciones del método analítico, tanto química como térmicamente. Los sistemas SIA generalmente emplean tubos de plástico, principalmente de politetrafluoroetileno

(PTFE), material hidrófobo resistente a la mayoría de los disolventes orgánicos. Sin embargo, existen en el mercado otro tipo de tubos que pueden ser útiles para aplicaciones muy específicas. La Tabla 1 muestra un resumen de los materiales más frecuentes y su resistencia química.

	PE /PP	PTFE FEP/ETFE	PC	PEEK	PVC
Ácidos	✓	✓	✓	✓	✓
Bases	✓	✓	X	✓	✓
Alcoholes alifáticos	✓	✓	✓	✓	✓
Aldehídos	✓	✓	✓	✓	✓
Éteres	✓	✓	X	✓	X
Hidrocarburos alifáticos	X	✓	✓	✓	✓
Hidrocarburos aromáticos	X	✓	X	✓	X
Hidrocarburos halogenados	X	✓	X	✓	X
Cetonas	X	✓	X	✓	✓

Tabla 1. Comparativa de la resistencia química de algunos de los materiales más comunes. PE: polietileno; PP: polipropileno; PTFE: politetrafluoroetileno; FEP: copolímero etileno-propileno fluorado; ETFE: etileno etrafluoroetileno; PC: policarbonato; PEEK: polieteretercetona; PVC: policloruro de vinilo.

Sistema de inserción

Los sistemas SIA emplean como sistema de inserción de muestras y reactivos una válvula de selección multiposición. Este tipo de válvulas presentan entre 6 y 14 posiciones periféricas que se conectan a una posición central que es la que se une a la jeringa, de forma que mediante el software se controla qué posición está conectada a la bomba en cada momento. Cada una de estas posiciones puede ser destinada a la entrada de muestra, reactivos o soluciones de limpieza, o bien pueden estar destinadas a conducir el flujo hacia el detector o hacia otros elementos adicionales, en función de los requerimientos del método analítico (sistemas de reacción, de separación o de tratamiento de muestra). Dotan al sistema de una gran versatilidad y sencillez de manejo, responsables en gran medida del éxito de estos sistemas.

La Figura 13 muestra una válvula multiposición junto con un esquema de las posiciones.

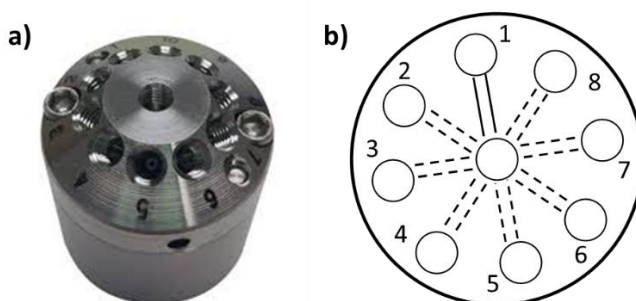


Figura 13. A) Imagen de una válvula multiposición; b) esquema interno de las posiciones de una válvula multiposición en el que se encuentra activa la posición 1 (representado mediante líneas continuas).

Entre la jeringa y la válvula de selección generalmente se ubica un bucle de retención o *holding coil*, que se encarga de que el conjunto de todas las disoluciones aspiradas no alcance la jeringa, evitando así fenómenos de contaminación y eliminando pasos adicionales de limpieza de la misma que alargarían el método y, en consecuencia, disminuirían la frecuencia de muestreo. Se trata normalmente de un tubo de longitud suficiente para albergar el bolo de muestra y/o reactivos aspirados, enrollado en forma de serpentina sobre una estructura cilíndrica que minimiza el espacio que ocupa en el sistema, a la par que favorece la mezcla entre muestras y reactivos. La Figura 14 muestra un sistema SIA simplificado donde se puede apreciar la función de dicho bucle.

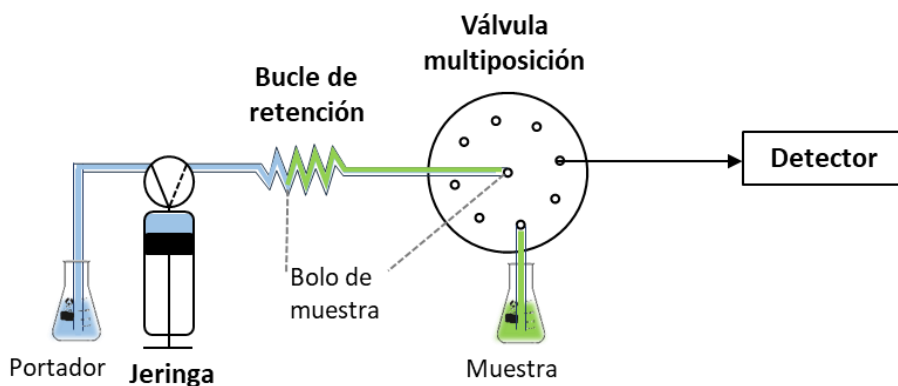


Figura 14. Esquema de un sistema SIA tras la aspiración de la muestra. Se observa como el bolo de muestra (en color verde) no alcanza la jeringa gracias a la longitud del bucle de retención.

Elementos adicionales

Existen otros elementos adicionales que pueden añadirse al sistema en función de las necesidades del método analítico. Algunos de estos elementos son:

- Bucles de reacción, equivalentes al bucle de retención, pero dispuestos en otra ubicación entre la válvula de selección y el detector. Permiten una mezcla más eficaz entre muestra y reactivos, aunque aumentan la dispersión del analito en el sistema, disminuyendo la sensibilidad en la detección. Por ello, en la mayoría de ocasiones es el propio bucle de retención el que ejerce esta función sin necesidad de añadir bucles adicionales.
- Elementos de tratamiento de muestra, capaces de llevar a cabo operaciones preparativas como la LLE (unidades de extracción por disolvente, separadores de fase, etc.), extracción en fase sólida o sistemas de limpieza o separación (mini columnas rellenas de un sólido adecuado, columnas monolíticas, etc.). También pueden acoplarse instrumentos adicionales que participen de dicho tratamiento de muestra, tales como elementos de calefacción, agitación por ultrasonidos o magnética.
- Válvulas adicionales que permitan la expansión del sistema.
- Unidades más complejas o interfases que permiten su acoplamiento a otros sistemas de flujo [55] o instrumentos de separación [56].

Algunos de estos elementos serán comentados más a fondo en el apartado “3.2. Automatización del tratamiento de muestra”.

Ventajas e inconvenientes

Una de las cualidades por las que el SIA destacó en sus inicios frente a los sistemas FIA clásicos es su gran flexibilidad en la configuración del sistema, siendo capaz de adaptarse a distintas metodologías sin necesidad de reconfiguración física. En los sistemas FIA es necesario cambiar la longitud del bucle de carga en la válvula de inyección cuando se quiere modificar el volumen de muestra; de igual forma, la inclusión de reactivos adicionales supone la inclusión de nuevos canales e intersecciones en el sistema. Sin embargo, en un sistema SIA la mayoría de estas modificaciones pueden llevarse a cabo mediante una reconfiguración en el software de control del sistema.

Su versatilidad y simplicidad no fue el único motivo de su éxito, sino que además presenta otras ventajas que cubren algunas deficiencias de los sistemas FIA:

- ✓ Bajo consumo de reactivos y muestras: no es necesario un flujo continuo de las distintas disoluciones en el sistema, sino que se usan sólo los volúmenes realmente necesarios.
- ✓ Capacidad para aspirar y dispensar volúmenes exactos, sin necesidad de recalibraciones y ajustes derivados del envejecimiento de los tubos flexibles empleados en las técnicas FIA.

- ✓ Una mezcla más eficiente: la muestra y los reactivos son aspirados hacia la jeringa (normalmente sin llegar a ella) a través del bucle de retención, para después ser dirigidos hacia el sistema en sentido contrario. Este movimiento de oscilación permite una mezcla eficiente sin necesidad de incorporar largos bucles de reacción, sobre todo si se repiten varios ciclos.
- ✓ Ausencia de los tubos flexibles típicos de los sistemas FIA, posibilitando su compatibilidad con un mayor número de disolventes y disoluciones ácidas.
- ✓ Posibilidad de acoplamiento con otras técnicas y sistemas de análisis [55].

Sin embargo, estos sistemas también presentan algunas desventajas frente a sus antecesores, las cuales a su vez derivan de sus virtudes:

- Menor frecuencia de muestreo, debido a que la jeringa tiene que aspirar las disoluciones antes de enviarlas al sistema, aumentando el tiempo de análisis.
- Al tratarse de un sistema monocanal, la mezcla de reactivos y muestra, sobre todo cuando se precisa de la inserción de varios reactivos o de soluciones tamponantes, es menos eficiente que en los sistemas FIA multicanal con intersecciones entre los diferentes canales

- Necesitan del uso de un ordenador y un software de control adecuado, lo cual puede aumentar el coste del sistema frente al FIA.

3.1.2. Análisis por inyección en flujo multijeringa (MSFIA)

El MSFIA es una técnica de análisis continuo o en flujo no segmentado introducida por primera vez en 1999 por Cerdà y colaboradores [12], descrita por sus creadores como una alternativa rápida y robusta a sus antecesores.

Estos sistemas se basan en el uso de una bureta automática convencional (de las que se suelen utilizar en los sistemas SIA), modificada para poder controlar simultáneamente hasta cuatro jeringas. De este modo, se combinan la alta configurabilidad de los sistemas multicanal tipo MCFIA con la robustez y versatilidad del SIA, evitando los inconvenientes asociados al uso de tubos flexibles en las bombas peristálticas.

La Figura 15 muestra un sistema MSFIA y sus componentes, de los cuales profundizaremos a continuación solamente en aquellos que difieren de los presentes en los sistemas SIA (ya descritos en el apartado anterior).

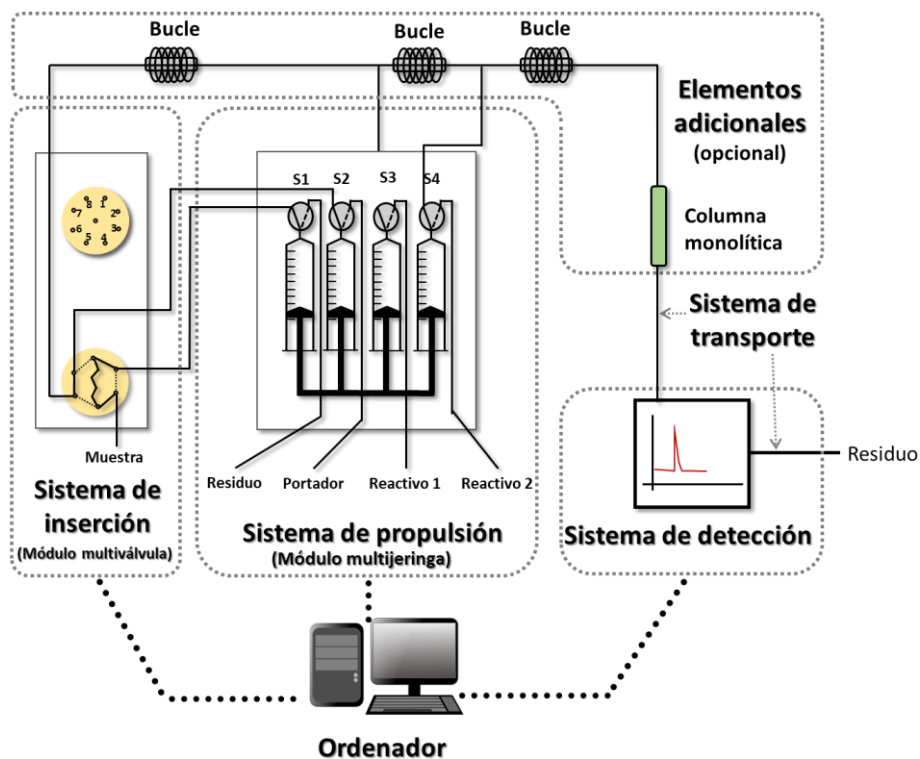


Figura 15. Esquema general de los componentes de un sistema MSFIA.

Sistema de propulsión

Para impulsar el flujo de líquido en el sistema, los sistemas MSFIA emplean una bureta automática tipo SIA, adaptada para mover simultáneamente hasta cuatro jeringas, cuyos pistones están conectados en bloque a un mismo motor de pasos. En este tipo de motores, también conocidos como motores paso a paso (o en inglés *“single step motor”*), el recorrido total se divide en un número de desplazamientos discretos o “pasos” que el motor es capaz de realizar con precisión. El número de pasos del motor equivale al número de desplazamientos en los que se divide el recorrido total del pistón de la

jeringa, definiendo así su resolución. En función de la capacidad de cada jeringa y de la resolución del motor, se pueden obtener una gran variedad de combinaciones de volúmenes y caudales configurables en el sistema. Actualmente existen equipos con motores de hasta 40000 pasos de resolución y jeringas intercambiables de diferentes volúmenes (generalmente entre 0.5 y 25 mL) [57,58]. Por ejemplo, en un sistema como el empleado en los trabajos desarrollados en esta Tesis Doctoral, cuyo motor tiene una resolución de 40000 pasos, operando con jeringas de 2.5 y 1 mL, pueden dispensarse con precisión volúmenes de hasta 62.5 y 25 μ L, respectivamente.

A la cabeza de cada jeringa se encuentra una válvula de conmutación solenoide de tres vías que opera de forma independiente, dirigiendo el sentido del flujo dispensado por cada una de las jeringas hacia el sistema o hacia el reservorio correspondiente, según convenga en cada paso. Cada válvula actúa como un conmutador controlado por el mismo software del sistema, alternando entre dos posiciones, OFF y ON, permaneciendo en todo momento dos de las tres vías conectadas. En la Figura 16 se muestra un esquema del funcionamiento de una válvula solenoide: en posición OFF, el solenoide que está conectado al generador está relajado y la armadura es empujada hacia abajo, conectando la posición 0 con la 2; sin embargo, en posición ON, se le transmite al solenoide una cierta cantidad de energía proporcional al pulso eléctrico y la armadura (en forma de T invertida) es atraída hacia arriba; de esta forma se bloquea y conecta las posiciones 0 y 1 durante el tiempo que permanezca en esta posición.

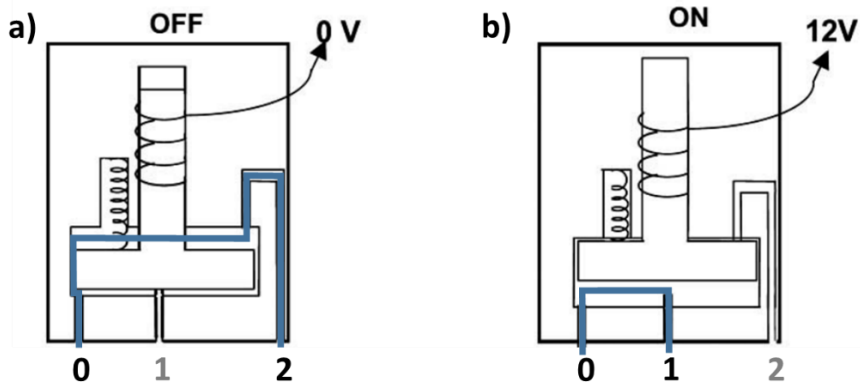


Figura 16. Esquema general del funcionamiento de una válvula solenoide. a) Posición "OFF"; b) Posición "ON". En un módulo multijeringa, la posición 0 corresponde con la cabeza de la jeringa, mientras que las posiciones 1 y 2 suelen conectarse al sistema y al correspondiente reservorio, respectivamente. Se ha representado mediante una línea azul el camino que recorre el flujo en cada posición.

De este modo se consigue minimizar el consumo de las disoluciones empleadas en el sistema, pues sólo se enviarán hacia el mismo cuando sea necesario, mediante la activación de la válvula de la correspondiente jeringa (generalmente se usa la posición "ON" para enviar hacia el sistema, mientras que cuando la válvula está desconectada o en posición "OFF" se conecta con los diferentes reservorios).

La Figura 17 muestra una imagen del módulo multijeringa empleado en esta Tesis.



Figura 17. Imagen del módulo multijeringa empleado.

En la parte posterior del módulo multijeringa existen cuatro puertos suplementarios que proporcionan un voltaje regulable de hasta 13 V con una corriente máxima de 5 A. A través de ellos se pueden conectar y controlar válvulas de conmutación adicionales u otros elementos como sistemas de calentamiento o agitación, o incluso sistemas de detección.

Además, el módulo presenta otra salida adicional que permite su conexión a otro módulo con la misma configuración de comunicación, como puede ser un módulo de válvulas, un módulo multijeringa adicional, o un automuestreador.

Sistema de inserción

El sistema multijeringa precisa de elementos adicionales para poder insertar volúmenes determinados de muestra en el sistema. Para ello, se han usado diferentes estrategias a lo largo de los años [59].

En las primeras versiones, se empleaba una válvula rotatoria de inyección de 6 vías a través de la conexión de un módulo adicional. Cada uno de estos puertos está conectado a uno de sus adyacentes en función de la posición de un elemento móvil o rotor, cuyo giro permite el intercambio entre las dos posiciones fijas: llenado e inyección. Estas válvulas permiten la inyección en el sistema de un volumen de muestra determinado, el cual queda definido por la longitud del bucle de carga. La Figura 18 muestra el funcionamiento de una válvula de este tipo.

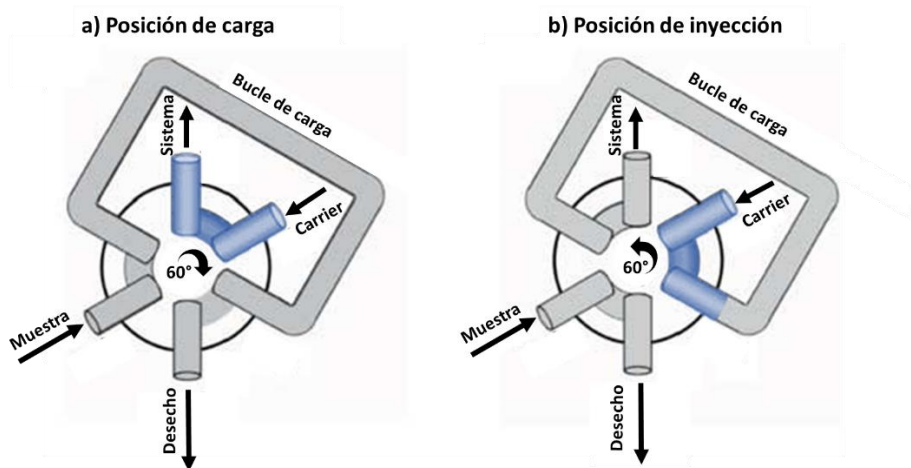


Figura 18. Esquema del funcionamiento de una válvula de inyección.

En el segundo prototipo de MSFIA, la válvula de inyección fue sustituida por dos válvulas solenoides de tres vías independientes situadas en la parte superior del módulo multijeringa, entre las cuales

se incorpora un bucle de carga de un determinado volumen, obteniendo así un sistema de funcionamiento similar a la válvula de inyección clásica del FIA, pero más compacto y económico.

Esta forma de inyección derivó en sistemas más simples y versátiles, en los que se elimina el uso de un bucle de carga de volumen prefijado asociado a dos válvulas solenoides, y se sustituye por una sola válvula precedida por un bucle de retención lo suficientemente largo que permite la inyección de diferentes volúmenes sin necesidad de modificación física del sistema, de forma similar a como se hace en SIA.

Los sistemas MSFIA de última generación permiten además la conexión de módulos de válvulas adicionales que dotan al sistema de una alta versatilidad. Estos módulos generalmente incorporan 2 válvulas de selección de 8 o más puertos, las cuales se conectan a 2 jeringas del sistema. De este modo el sistema se comporta como un doble sistema SIA simultáneo en el que la mezcla de líquidos es más eficaz.

La Figura 19 muestra el módulo de válvulas empleado en esta Tesis, compuesto por una válvula de selección de 8 puertos y una válvula de inyección de 6 vías. De este modo, el sistema adquiere una alta versatilidad y configurabilidad.



Figura 19. Imagen del módulo multiválvula empleado.

Elementos adicionales y software de control

Además de los elementos adicionales mencionados en los sistemas SIA, como los bucles de reacción, sistemas de tratamiento de muestra, etc., o las distintas vías de incorporar válvulas adicionales ya mencionadas en el apartado anterior, los sistemas MSFIA destacan por permitir la combinación de diferentes instrumentos, los cuales pueden ser controlados por el mismo software del sistema multijeringa: AutoAnalysis [60].

El principal inconveniente de la mayoría de los paquetes de software comerciales disponibles para el control de sistemas SIA y

MSFIA es su alta especificidad para una determinada configuración del instrumento, dificultando la incorporación de elementos electrónicos adicionales (sistemas de propulsión, válvulas, equipos de medida, etc.) o haciendo necesario el uso de varios ordenadores independientes para controlar todo el sistema. El software AutoAnalysis, y en concreto su versión 5.0 empleada en la presente Tesis Doctoral, se compone de una aplicación principal independiente de la configuración del sistema, complementada con un conjunto de librerías de enlace dinámico o DLL para la conexión y control de diferentes componentes. De este modo, mediante el software principal se seleccionan los elementos que conforman el sistema, para posteriormente editar el procedimiento analítico en forma de una secuencia de instrucciones que serán ejecutadas por el componente adecuado en cada caso.

De este modo, el software puede controlar, mediante la DLL adecuada, no solo módulos multijeringa o de válvulas adicionales, sino también otros sistemas como bombas peristálticas, multibombas tipo MPFS, sistemas SIA, automuestreadores, etc. e incluso instrumentos de medida y detección como pH-metros, fluorímetros, espectrofotómetros UV-VIS o fotómetros de llama, entre otros, permitiendo además el tratamiento de datos dentro del mismo software [61]. Además, pueden desarrollarse nuevas librerías para otros elementos en función de las necesidades del usuario, aumentando la versatilidad de estos sistemas MSFIA.

Ventajas e inconvenientes

Estos sistemas comparten muchas de las ventajas de sus predecesores [59]:

- ✓ De los sistemas SIA hereda las virtudes mencionadas anteriormente, como el bajo consumo de reactivos y muestra, la ya mencionada ausencia de tubos flexibles, o la capacidad de aspirar y dispensar volúmenes exactos.
- ✓ Velocidad y facilidad de mezcla de reactivos propia de los sistemas FIA, debido a la posibilidad de mezclar las distintas disoluciones en paralelo.
- ✓ El empleo de válvulas solenoides propias de los sistemas MCFIA le aporta una mayor configurabilidad y versatilidad.
- ✓ Mayor capacidad de acoplamiento con otras técnicas y sistemas de separación [62].

En cuanto a sus desventajas, podemos destacar las siguientes:

- Menor frecuencia de muestreo, debido a que la jeringa tiene que aspirar las disoluciones antes de enviarlas al sistema, aumentando el tiempo de análisis.
- El movimiento en bloque de las 4 jeringas puede resultar limitante si se quieren dispensar simultáneamente volúmenes diferentes con distintas jeringas, ya que una vez establecido el volumen y caudal de una de ellas el resto se ajusta de manera automática en función de su tamaño.

- Necesitan del uso de un ordenador y un software de control adecuado, lo cual incrementa los costes del sistema.

3.1.3. Sistemas de detección

Los sistemas de detección son instrumentos de análisis capaces de medir una propiedad del analito a determinar (ya sea propia del analito en cuestión o bien de algún producto de reacción generado antes de llegar al detector), la cual está relacionada con su concentración mediante una función matemática. Los detectores empleados en los sistemas de flujo deben cumplir los siguientes requisitos:

- Adecuación al analito a determinar: la selección del método de detección más adecuado dependerá de la naturaleza del analito, escogiendo aquellas propiedades fisicoquímicas que permitan obtener buenos parámetros de sensibilidad y selectividad.
- Capacidad de realizar medidas continuas, dando lugar a señales rápidas y reproducibles.
- Permitir la inserción de una cubeta o célula de flujo adecuada que no produzca sobrepresiones en el sistema y a través de la cual se realizarán las medidas en tiempo real. De este modo, el flujo se hace pasar a través de la cubeta, registrando una señal constante que se ve alterada con la llegada del analito al detector.

La mayoría de los detectores más comúnmente empleados en las técnicas de flujo pueden agruparse en dos tipos fundamentales: detectores ópticos y detectores electroquímicos.

Detectores ópticos

Los detectores ópticos se basan en la interacción entre la radiación electromagnética y el analito. En función del tipo de radiación electromagnética y de la propiedad medida (absorción o emisión de radiación) podemos destacar los siguientes:

Espectrofotometría de absorción molecular UV-Visible

Este detector mide la absorbancia a una longitud de onda seleccionada en esta región del espectro electromagnético [63]. Esta longitud de onda se selecciona en función del espectro de absorción del analito, buscando aquella a la que presente mayor absorbancia y menor interferencias. Constituye una de las técnicas más empleadas, debido a que existen una gran cantidad de especies que absorben radiación en esta región del espectro [64,65] o bien son susceptibles de derivatización, formando un compuesto coloreado al reaccionar con un reactivo adecuado [66,67]. Sin embargo, sus principales inconvenientes son la baja sensibilidad y selectividad en comparación con otras técnicas de detección.

Luminiscencia molecular

En este caso el detector mide la energía emitida por la muestra en forma de radiación electromagnética (ya sea en la región ultravioleta, visible o infrarrojo cercano). Esta emisión se produce como resultado de la transición electrónica desde un estado excitado a un estado de menor energía, normalmente el estado fundamental. Este tipo de emisión se puede manifestar de diferentes formas [68,69]. Las

formas de luminiscencia más relevantes desde el punto de vista analítico son las siguientes:

- *Fluorescencia molecular*

Se trata de un proceso en el que el analito absorbe una cantidad adecuada de energía electromagnética (fotón) capaz de producir el salto de un electrón a un orbital de mayor energía (singlete), para volver a su estado original liberando energía en forma de radiación electromagnética. Este proceso ocurre muy rápidamente debido a que el spin del electrón permanece inalterado y por ello puede regresar a su estado original de forma inmediata (del orden de los nanosegundos).

Esta forma de detección es una de las más usadas, debido a que es muy susceptible de miniaturización y económica con respecto a otro tipo de detectores. Además, proporciona una alta selectividad ya que son pocos los analitos que presentan esta propiedad de forma nativa [70–72]. Esto constituye una de sus principales limitaciones, aunque en ocasiones puede ser solventada por medio de reacciones derivatizadoras [35,73,74] o del uso de la fluorescencia fotoinducida [75,76].

Todos los estudios recogidos en esta Memoria de Investigación emplearon un espectrofluorímetro como sistema de detección.

- *Fosforescencia*

Se trata de un proceso similar a la fluorescencia, pero mucho más lento debido a que durante la relajación, el electrón debe pasar por

un estado intermedio (estado triplete) mediante un cambio en su spin. Este tipo de luminiscencia es poco común en disolución, ya que requiere de cierta rigidez de la molécula para que este fenómeno se vea favorecido. Por este motivo, su uso no está tan extendido en los sistemas de análisis en flujo [77,78].

- *Quimioluminiscencia*

En este caso la emisión de radiación electromagnética (normalmente en la región del visible o el infrarrojo cercano) se produce como resultado de una reacción química en la que un intermedio o producto de reacción se encuentra en un estado excitado y libera energía para llegar a su estado fundamental en forma de fotón [79]. Debido a su gran especificidad, esta técnica de detección es altamente empleada [80–84].

- *Luminiscencia sensibilizada por lantánidos (LSL)*

Este tipo de luminiscencia se basa en la formación de un complejo entre el analito (que ha de ser fluorescente por naturaleza) y un ion lantánido (generalmente europio o terbio), que actúan como fluoróforos. En este tipo de complejos, se produce una excitación a las longitudes de onda propias del analito o ligando orgánico, seguida de una transferencia de energía intramolecular hacia el ion lantánido, para finalmente producirse la emisión de energía a las longitudes de onda propias del fluoróforo. Este tipo de luminiscencia tiene un elevado tiempo de vida media, con lo cual puede conseguirse una gran selectividad en las medidas de fluorescencia retardada, evitando así las interferencias de otros

compuesto fluorescentes [85,86]. Sin embargo, su uso está muy limitado, ya que existen pocos compuestos capaces de formar este tipo de complejos.

Espectroscopía vibracional

El uso de detectores basados en técnicas vibracionales (especialmente las basadas en el uso de transformada de Fourier) ofrecen multitud de ventajas como su alta velocidad de barrido, una alta resolución y amplio rango de trabajo, o la variedad de bandas que pueden usarse para la determinación de un solo compuesto o para el análisis multianalito [87].

- *Espectroscopía infrarroja*

Es la técnica vibracional más representativa. Se basa en la interacción con radiación electromagnética de más baja energía (en la zona del infrarrojo medio y cercano generalmente) que produce saltos vibracionales en moléculas con enlaces polares. Concretamente, la espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) [88–90] es la más empleada debido a que ofrece ventajas adicionales como la posibilidad de realizar análisis multianalito sin necesidad de etapas previas de separación. Sin embargo, presenta desventajas como la falta de transparencia de los disolventes empleados en la región del espectro correspondiente al infrarrojo, lo cual disminuye significativamente su sensibilidad, y la dificultad de montaje y limpieza de las células [87,91].

- *Espectroscopía Raman*

La espectroscopía Raman es, al igual que la espectroscopía IR, una técnica de detección que proporciona información molecular y estructural que hace que sea altamente selectiva y aplicable a especies tanto inorgánicas como orgánicas. Presenta ventajas adicionales como el requerimiento de pequeños volúmenes de muestra o la ausencia de la influencia negativa de la humedad. Sin embargo, su baja sensibilidad hace que sea una técnica poco explotada [92,93]. Con el descubrimiento de la espectroscopía Raman sensibilizada en superficie (SERS), se solventan los problemas de sensibilidad mediante la combinación de efectos químicos y electrónicos que se producen al retener la muestra sobre una superficie adecuada (normalmente plata, oro o cobre) [87,94,95].

Espectroscopía atómica

Después de la espectroscopía UV-VIS, las técnicas de espectroscopía atómica son las más empleadas en la mayoría de los sistemas de análisis en flujo. En general, estas técnicas se caracterizan por ser más selectivas y sensibles que las técnicas moleculares. Sin embargo, no están exentas de interferencias (especialmente si la matriz de la muestra presenta un alto contenido en sales), por lo que normalmente es necesario aplicar tratamientos de muestra adecuados previos a la detección [96].

Por ello, estas técnicas se benefician de su acoplamiento con sistemas de análisis en flujo, los cuales no solo actúan como medio de

transporte de la muestra al detector, sino que permiten la incorporación de etapas de tratamiento de muestra como la LLE o la SPE, e incluso otras técnicas más específicas para este tipo de detectores como la generación de hidruros o la digestión por microondas [96–99]. Además, los instrumentos empleados en estos sistemas de detección operan de forma continua y no precisan del uso de células de flujo, lo cual hace más fácil su acoplamiento, solventando el problema del consumo excesivo de muestra en algunos tipos de estas técnicas. Las técnicas más usadas en combinación con el análisis en flujo son la espectrometría de absorción atómica de llama (FAAS, *Flame Atomic Absorption Spectroscopy*) [100–103], la fluorescencia atómica (AFS, *Atomic Fluorescence Spectroscopy*) [104,105] y la espectrometría de masas por plasma acoplado inductivamente (ICP-MS, *Inductively Coupled Plasma Mass Spectroscopy*) [106].

Detectores electroquímicos

Los detectores electroquímicos se basan en la interacción de la muestra con la energía eléctrica. La principal ventaja que presentan este tipo de técnicas es que la señal generada es una señal eléctrica que no precisa ser transformada para su procesamiento. Generalmente, los procesos electroquímicos que generan la señal ocurren en una superficie, por lo que el analito ha de entrar en contacto físico con los electrodos en el interior de la célula de flujo.

En la mayoría de los métodos, se mide una propiedad dependiente de la concentración del analito como puede ser el voltaje, la corriente, la resistencia o la carga. En función de la señal eléctrica

medida, se pueden distinguir los siguientes tipos de técnicas electroquímicas [107]:

Conductimetría

En este tipo de técnicas no tiene lugar ninguna reacción electroquímica en el electrodo, sino que se mide la conductividad del conjunto de la muestra [108,109]. Su principal desventaja es su falta de especificidad, debido a que todos los iones presentes en la muestra contribuyen a la señal analítica.

Potenciometría

En este caso se produce una reacción de equilibrio en un electrodo no polarizado: se mide la diferencia de potencial entre dos electrodos en condiciones de corriente constante (generalmente cero) [110,111]. Estos métodos pueden ser específicos en la medida en que existan electrodos selectivos al ion a determinar (como los electrodos de pH o flúor, por ejemplo). Además, presenta otras ventajas como la simplicidad del dispositivo experimental, su sensibilidad, o su rapidez de respuesta. Algunas de sus desventajas más importantes son la difícil interpretación de la medida si el ion a determinar está prácticamente complejo, y el hecho de que son sensibles a la actividad iónica solo en las zonas más cercanas a la membrana.

Voltametría y amperometría

Estas técnicas se basan en la medida de la corriente en un electrodo polarizado donde se fuerza una reacción electroquímica por

medio de la aplicación de un voltaje externo, el cual puede ser variable (voltimetría) [112,113] o constante (amperometría) [114–116].

Culombimetría

La culombimetría está basada en la medida de la corriente en función del tiempo, cuya integración proporciona el valor de la carga consumida durante la reacción electroquímica cuando un potencial es aplicado [117,118]. Dicha carga está directamente relacionada con la cantidad de analito presente en la muestra, con lo cual en este tipo de técnicas no se precisa una curva de calibrado, siendo esta una de las grandes ventajas de la culombimetría.

3.2. Automatización del tratamiento de muestra

La mayoría de los métodos de análisis para la determinación de los analitos a nivel de trazas en muestras complejas deben cumplir unos altos requerimientos en cuanto a sensibilidad y selectividad. Por este motivo se incorporan etapas de tratamiento de muestra que permitan separar el/los analitos de las posibles interferencias de la matriz, así como preconcentrarlos en un medio más apropiado al sistema de detección que se va a emplear.

El tratamiento de muestra es la etapa más compleja y variable del proceso analítico, dado que implica la aplicación por parte del operador de técnicas de separación generalmente tediosas que consumen grandes cantidades de tiempo, muestra y reactivos y/o disolventes, en muchas ocasiones tóxicos y contaminantes. Además, el factor humano hace que estas etapas sean la principal fuente de error analítico y, por tanto, suponen la mayor contribución a la incertidumbre del análisis [119,120]. Es por ello que se realizan grandes esfuerzos dirigidos a automatizar, miniaturizar y simplificar las operaciones de preparación de muestra, cumpliéndose así con la mayoría de los principios básicos de la Química Verde.

Continuamente surgen avances en la automatización de diferentes tipos de técnicas de tratamiento de muestra aplicadas a todo tipo de matrices. Sin embargo, el tratamiento de muestras sólidas o con un alto contenido en sólidos en suspensión continúa siendo altamente difícil de implementar en sistemas automáticos de análisis en flujo. Aun así, han aparecido diversas metodologías para implementar de forma

online la disolución de matrices inorgánicas o fármacos, entre otros, así como digestión o mineralización de muestras biológicas u orgánicas para análisis de metales u otros elementos e interés, como nitrógeno o fósforo [121].

En cuanto al tratamiento de muestras líquidas, su automatización está más extendida. Entre ellas, sin duda las más empleadas son la extracción líquido-líquido (LLE, *Liquid-Liquid Extraction*) y la extracción en fase sólida (SPE, *Solid Phase Extraction*), en los cuales el analito en disolución es transferido a una nueva fase, líquida o sólida, respectivamente. En ambos casos, la automatización puede llevarse a cabo mediante tres vías [122]:

- Sistemas basados en flujo, en los que todo el proceso de extracción ocurre en el interior de un sistema de flujo continuo.
- Sistemas discontinuos o *batch*, en los que se emulan procesos manuales de extracción empleando la jeringa de un automuestreador y un vial.
- Mediante la combinación de los dos anteriores (*Flow-Batch Analysis*), introduciendo un elemento discontinuo en un sistema de flujo [123]. Este elemento generalmente se trata de una cámara de mezcla dónde se interrumpe el flujo para recrear procesos manuales de extracción y/o separación.

3.2.1. Extracción líquido-líquido (LLE)

La LLE se basa en la transferencia de las sustancias de interés entre dos disoluciones inmiscibles entre sí, generalmente entre una fase acuosa y una orgánica. Esta técnica es ampliamente utilizada para: a) separar el analito de otras especies interferentes presentes en la matriz de la muestra, incrementando la selectividad del método analítico; b) para preconcentrarlo en un menor volumen de disolvente, aumentando así la sensibilidad del método; c) para transferirlo a un disolvente más afín a la técnica de detección que se va a utilizar posteriormente.

Esta técnica ofrece muy buenos resultados y es fácil de aplicar, por lo que es ampliamente utilizada en el análisis de todo tipo de muestras. Sin embargo, puede llegar a ser muy tediosa y, por norma general, requiere del uso de largos tiempos y del empleo de grandes cantidades de disolventes orgánicos, en ocasiones volátiles y tóxicos o inflamables, lo que supone un riesgo para el operador [124]. Es por ello que la automatización de la LLE presenta numerosas ventajas frente a los métodos manuales:

- ✓ Reducción de los volúmenes de disolventes orgánicos (y de sus riesgos asociados).
- ✓ Reducción de los tiempos de ejecución.
- ✓ Incremento de la precisión, característica de los sistemas de flujo.

Existen multitudes de formas de automatizar la LLE, algunas difíciles de clasificar y delimitar, aunque se pueden englobar en dos

grupos principalmente: técnicas dispersivas y técnicas no dispersivas [122,125].

Técnicas no dispersivas

En la LLE no dispersiva no se produce la emulsificación de las fases, sino que éstas permanecen bien delimitadas por la interfase. Existen diferentes modalidades de este tipo de extracción, cada una de ellas con múltiples variables y combinaciones. Sin embargo, se pueden agrupar en los siguientes grupos básicos [125,126]:

Extracción líquido-líquido convencional en continuo (CCLLE)

Se trata de la variante más simple y fácil de implementar en cualquier sistema de flujo. Estos sistemas están basados en los primeros trabajos que incorporaban la LLE en sistemas de flujo tipo FIA [127,128]. La mayoría de los sistemas se componen de tres elementos básicos [129,130]:

1. Un segmentador, encargado de poner en contacto los flujos de las dos fases, acuosa y orgánica. El resultado es un único flujo conformado por segmentos alternos de ambas fases. Los segmentadores más ampliamente utilizados se basan en una confluencia de tres puntos en la que ambas fases entran en contacto en diferentes ángulos, como muestra la Figura 20.

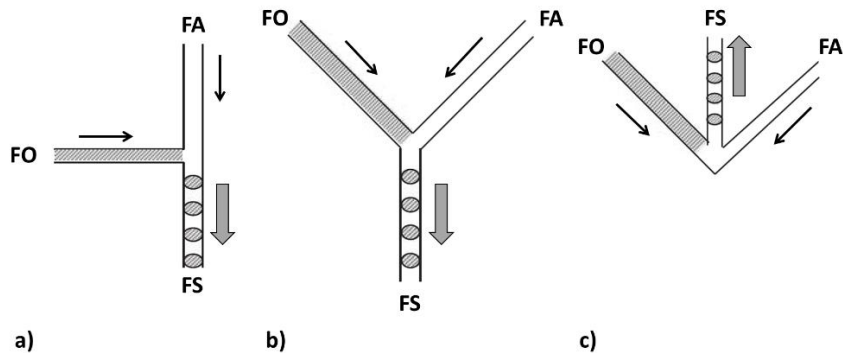


Figura 20. Esquema de las geometrías más típicas empleadas en segmentadores: a) configuración tipo T, b) configuración tipo Y, c) configuración tipo W. FO: fase orgánica; FA: fase acuosa; FS: fase segmentada. Las flechas indican el sentido del flujo.

2. Un bucle de extracción donde tiene lugar la transferencia de masa a través de las múltiples interfases generadas por los segmentos. Se trata de un tubo, generalmente enrollado de forma helicoidal, cuya longitud (junto con la velocidad de flujo) determina el tiempo durante el cual las fases están en contacto.

El material del que está hecho es determinante para la eficacia del sistema, ya que determina el perfil del flujo: generalmente, una de las fases es más afín al material del tubo, formando una película alrededor de las paredes del mismo, mientras que la otra fase es repelida por dicho material, formando burbujas en el seno de la otra fase. De este modo, los tubos de teflón u otros polímeros apolares generan un flujo de fase orgánica en el que la fase acuosa forma las burbujas, mientras que en los tubos de vidrio es la fase orgánica la que forma las burbujas. La siguiente figura muestra el perfil del flujo obtenido en un tubo de teflón.

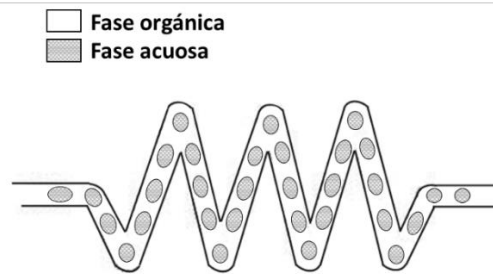


Figura 21. Esquema del flujo obtenido en un bucle de extracción constituido por un tubo de teflón.

3. Un separador de fases, donde se separan los segmentos en dos flujos independientes. En función de cómo se produce la separación, se pueden distinguir dos tipos de separadores [124,129]:

(a) separadores de densidad, donde las dos fases se separan por acción de la gravedad en función de su densidad

(b) separadores de afinidad y de membrana, en los que se emplean materiales hidrofílicos y/ lipofílicos para separar las fases, como puede ser el uso de membranas de permeabilidad selectiva a una de las fases (generalmente, la membrana empleada es afín a la fase aceptora o extractante).

La Figura 22 muestra un ejemplo de cada uno de estos tipos de separadores.

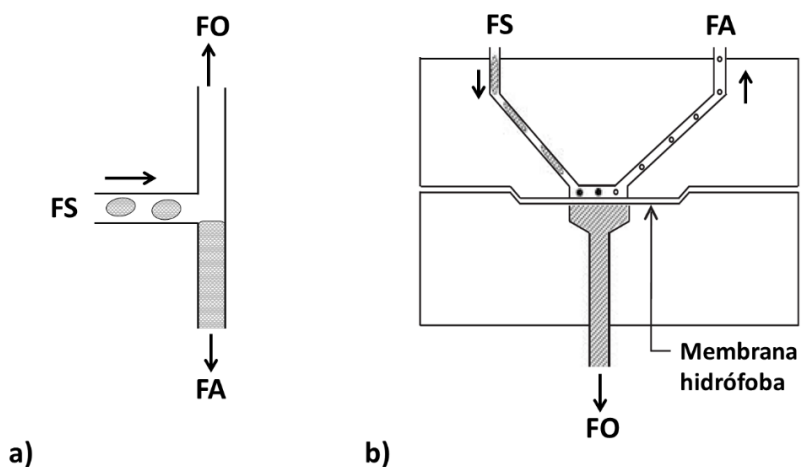


Figura 22. a) Separador de densidad en el cual la fase acuosa es más densa que la fase orgánica. b) Separador de membrana selectiva: deja pasar la fase orgánica a la vez que repele la acuosa. FO: fase orgánica; FA: fase acuosa; FS: fase segmentada. Las flechas indican el sentido del flujo.

Las etapas de segmentación y separación de fases pueden afectar a la eficiencia del proceso de extracción, así como a la precisión y la sensibilidad del método analítico. Esto es debido a la dificultad que supone generar segmentos reproducibles, así como conseguir una separación eficiente de las fases. De hecho, el separador de fases es probablemente el elemento más importante en este tipo de sistemas, ya que de él depende la recuperación de la máxima cantidad de extractante y que el flujo que finalmente llega al detector esté libre de cualquier contaminación procedente de la otra fase. A esto se suma otro de los grandes inconvenientes asociados a los sistemas FIA, de gran importancia en estos casos: la poca resistencia de los tubos flexibles empleados en las bombas peristálticas. Este inconveniente se puede solventar mediante la inserción de un dispositivo que permite crear un flujo de disolvente orgánico por desplazamiento de agua [124].

A raíz de estos inconvenientes ligados a los sistemas LLE-FIA iniciales, las tendencias actuales se centran en el diseño y la caracterización de nuevas estrategias para simplificar la configuración del sistema evitando el uso de segmentadores y/o separadores de fases, así como el empleo de sistemas basados en otros medios de propulsión, tales como SIA [131] o MSFIA [132].

Las alternativas que proponen eliminar el segmentador y el separador de fases, generalmente empleando un sistema FIA clásico, recurren a la inserción de un único segmento de extractante en el flujo de la muestra mediante una válvula de inyección, para posteriormente monitorizar la señal del detector sin separar las fases [133,134]. Con estos sistemas se consigue una alta preconcentración, pero suelen ser menos reproducibles. Estas estrategias se han implementado también en sistemas multiconmutados MCFIA [135,136]. Otras opciones descritas en sistemas MPFS [137] eliminan únicamente el segmentador, manteniendo la etapa de separación de fases.

Otras estrategias que se han desarrollado consisten en la combinación del modo clásico manual en un vial con la automatización en flujo (generalmente un sistema SIA o MSFIA), técnica conocida como *Flow-batch* [138]. En uno de los trabajos recogidos en esta Memoria de Investigación, se propone un método para la extracción de 4,4'.dihidroxibifenilo en muestras de aceite de oliva empleando un sistema MSFIA. En este caso, se sigue el esquema convencional descrito anteriormente, en el que muestra y extractante se ponen en contacto a través de un segmentador; pero se introduce un elemento discontinuo para separar las fases: a la salida del bucle de extracción, se coloca un

vial cónico de vidrio del volumen adecuado, en el cual las fases se separan por gravedad a flujo parado. Una vez separadas las fases, el extracto se reintroduce en el sistema de flujo para ser llevado al detector fluorimétrico.

Técnicas basadas en films

Estas técnicas, conocidas por su nombre en inglés como *Wetting film extraction*, se basan en sistemas de flujo sin separación de fases que aprovechan la distinta afinidad de las fases por el material que conforma los tubos y que es la responsable de la formación de una fina película de disolvente adherida sobre las paredes de los tubos de PTFE [139,140]. Tiene como resultado diferencias entre las velocidades de las fases orgánicas y acuosas, ya que la fase acuosa avanza mucho más rápido que la orgánica [130].

En esta técnica el disolvente orgánico es introducido en primer lugar en el bucle de extracción, seguido generalmente de aire (o agua en ocasiones), lo que ayuda a estabilizar la película de fase orgánica y a conseguir que esta actúe después como una fase pseudo-estacionaria. Después la muestra acuosa es introducida y se produce la extracción hacia la película de disolvente. Por último, la elución de dicha película que contiene el extracto se puede producir mediante dos vías [124]: mediante lavado o arrastre de la misma con un disolvente adecuado; o bien mediante una nueva extracción (o retro-extracción) del analito en una nueva fase acuosa que será la que es guiada al detector. La Figura 23 muestra el perfil del flujo en cada una de las etapas de un proceso con retro-extracción:

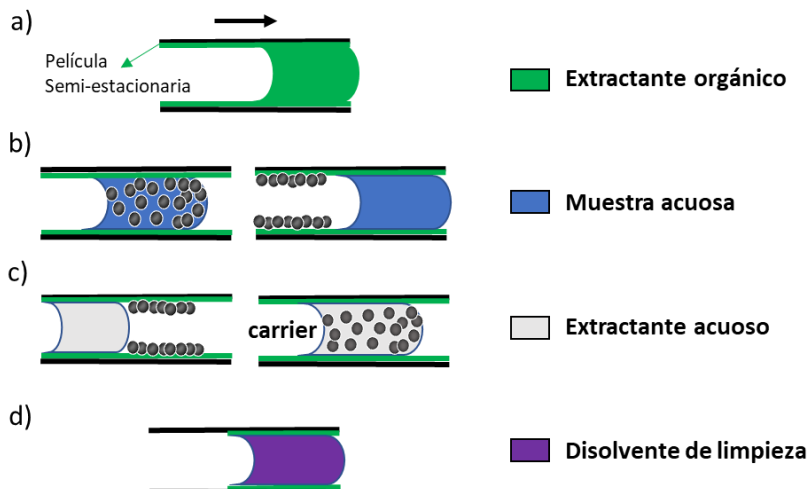


Figura 23. Representación gráfica del proceso de extracción retro-extracción empleando la técnica *wetting-film*. a) Formación de la película de disolvente orgánico. b) Inserción de la muestra acuosa y extracción del analito en la fase orgánica. c) inserción del extractante acuoso para la retro-extracción del analito. d) Limpieza del sistema mediante arrastre del *wetting-film* mediante un disolvente apropiado.

Esta técnica presenta la ventaja de producir extracciones eficientes con pequeñas cantidades de disolvente, sobre todo en aquellas que emplean la retro-extracción [141]. Sin embargo, existe el inconveniente de que la película de fase orgánica no queda inmóvil durante la extracción, sino que es lentamente arrastrada por el flujo de fase acuosa.

Microextracción en fase líquida (LPME)

La LPME no dispersiva engloba a un conjunto de técnicas que se basan en el uso de una cantidad muy pequeña de disolvente extractante, de unos pocos microlitros, frente a un volumen de muestra del orden de los mililitros [142].

La variante más simple de este grupo de técnicas es la *Single drop microextraction* (SDME), en la que se emplea una sola gota de fase extractante de un volumen generalmente inferior a los 5 μL . La extracción se puede producir por contacto directo con la muestra acuosa, mediante inmersión de la gota suspendida en un vial o cámara de extracción (DI-SDME, *Direct immersion single-drop microextraction*); o bien por exposición de la gota al espacio de cabeza que queda libre en dicha cámara (HS-SDME, *Head space single-drop microextraction*), sólo aplicable a analitos volátiles. En ambos casos, se puede favorecer y acelerar la extracción mediante la agitación de la muestra mediante ultrasonidos [143], agitación magnética [144] o aplicando gradientes de temperatura [145]. Una vez finalizada la extracción, la gota se recoge por aspiración y se lleva al detector correspondiente. En algunos sistemas descritos se realiza la detección *in situ* sobre la misma gota [146].

Aunque su automatización suele recaer en automuestreadores de jeringa (sistemas *batch*), también se han conseguido adaptar con éxito a sistemas SIA [147], en los que además del uso de sistemas de agitación convencionales, se puede favorecer la extracción mediante el paso de un flujo de muestra en continuo movimiento [148]. En la Figura 24 se muestra un ejemplo de un sistema de este tipo.

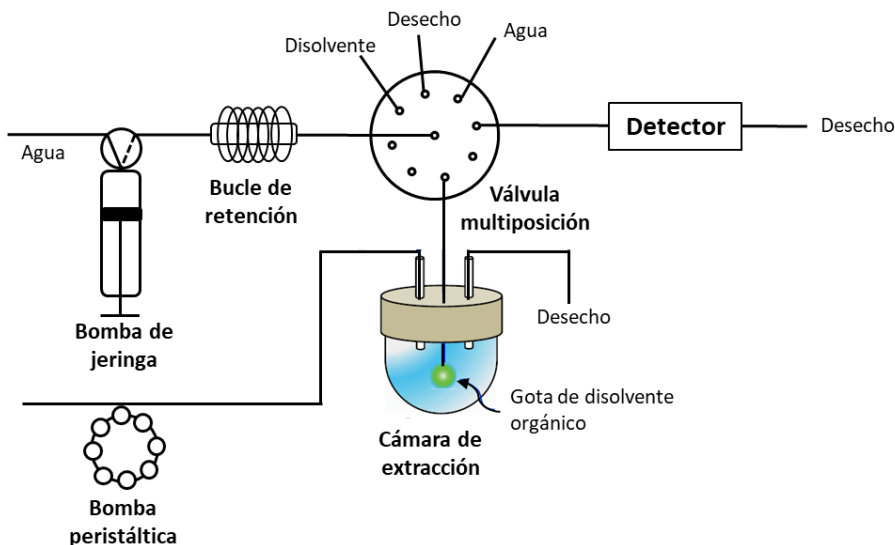


Figura 24. Sistema automático DI-SDME híbrido FIA-SIA, con flujo continuo de muestra y transporte de la gota al detector.

Estas técnicas son muy atractivas debido a su simplicidad y al reducido gasto de disolventes orgánicos. Sin embargo, su principal desventaja reside en la dificultad de conseguir la estabilidad y reproducibilidad de la gota, especialmente en sistemas de flujo.

Una forma de minimizar los problemas de inestabilidad de la gota, es mediante el uso de una membrana de material polimérico poroso e hidrofóbico (generalmente polipropileno) que actúa como soporte de la fase extractante y como barrera física entre las fases [149]. La principal ventaja de esta técnica es que es mucho más precisa y estable que las basadas en gotas, permitiendo además el uso de cantidades mayores de disolvente extractante.

Las técnicas basadas en membranas se pueden clasificar en tres grupos principales [126]. (a) En los sistemas basados en membranas planas, la membrana porosa actúa como barrera entre los canales de

flujo independientes de muestra y de extractante, permitiendo la difusión del analito hacia el extractante (Figura 25a, [150,151]); o bien puede actuar como soporte para la fase orgánica, separando los canales de flujo de dos fases acuosas, la de la muestra y la de un segundo extractante acuoso, permitiendo así la retro-extracción del analito (Figura 25b, [152,153]). (b) Las cromatomembranas están constituidas por un material hidrófobo biporoso que presenta microporos (de un diámetro inferior a 1 μm) y macroporos (de un diámetro mayor de 200 μm), diseñada de forma que la fase acuosa sólo es capaz de circular por los poros de mayor tamaño en una dirección mientras que la fase orgánica es capaz de circular por los microporos, produciéndose el contacto entre las fases en las intersecciones entre los micro- y macroporos (Figura 25c, [154,155]). (c) Los sistemas más destacados son los basados en membranas de fibra hueca (HF-LPME, *Hollow-fibre liquid phase microextraction*). Estos sistemas actúan de forma muy similar a los basados en gotas, sustituyendo la gota suspendida de una aguja o capilar por una fibra hueca del material hidrófobo impregnado del disolvente orgánico de extracción. En los sistemas de flujo continuo, esta fibra puede ser sumergida en la muestra en un vial de extracción (Figura 25d,[156]), o más frecuentemente introducirse en el interior de una cámara de extracción tubular por cuyo interior circula la muestra (Figura 25e, [157]).

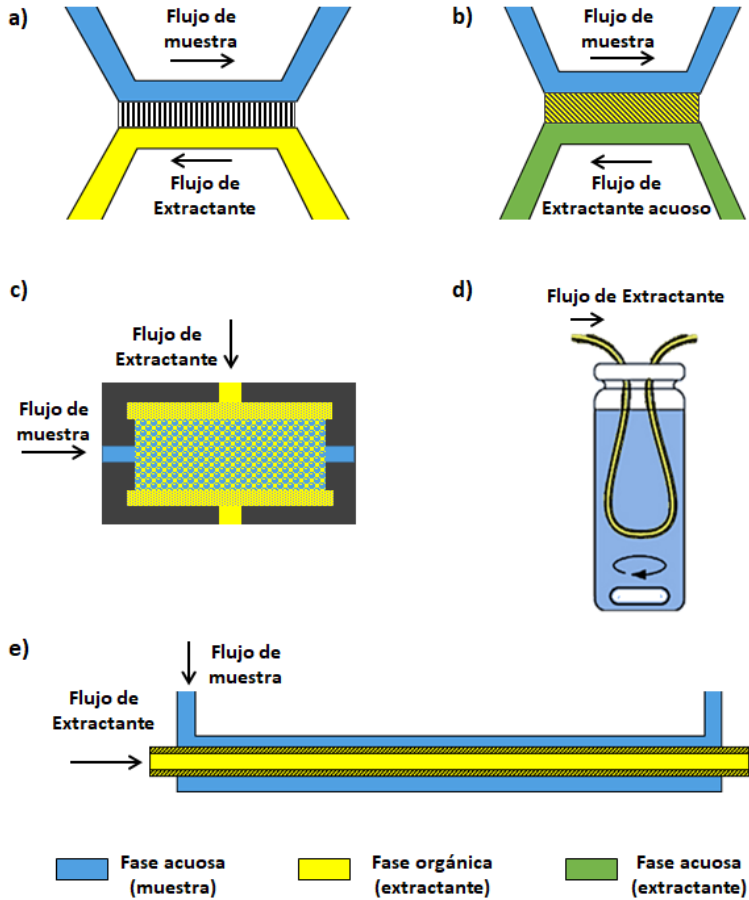


Figura 25. Esquema de los sistemas de extracción típicos de los sistemas de LPME basados en membranas.

La principal desventaja de este tipo de sistemas es la dificultad de su completa automatización. Aunque existen sistemas totalmente automatizados [157,158], en muchos de ellos la impregnación de la membrana se realiza de forma manual [159].

Técnicas dispersivas

Estas técnicas se basan en la dispersión de una pequeña cantidad de extractante en la muestra, aumentando considerablemente la superficie de contacto entre las fases y, en consecuencia, obteniendo una extracción más rápida y eficiente [122,160]. Esto puede conseguirse de dos formas diferentes:

Microextracción líquido-líquido homogénea (HLLME)

La HLLME consiste en el uso de un disolvente soluble en agua como extractante, formando así una disolución homogénea entre muestra y extractante, para posteriormente promover la separación de las fases a través de la saturación de la disolución mediante la adición de una cantidad adecuada de una sal [161], un sacárido [162] o un disolvente apropiado que hace que el disolvente deje de ser soluble en la fase acuosa [163], o en ocasiones mediante un cambio en el pH [164].

Microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME)

La DLLME [165] se caracteriza por la dispersión del extractante, generalmente la fase orgánica, en la fase acuosa en forma de finas gotas, consiguiendo así una alta superficie de contacto. Esto se consigue gracias al uso de un disolvente auxiliar miscible con ambas fases, conocido como agente dispersante, el cual hace posible la formación de la emulsión. Este disolvente es el componente mayoritario de la fase orgánica, mientras que se requiere muy poco volumen de agente extractante con respecto a la disolución de la muestra. Posteriormente, es necesaria la separación de las fases previamente al análisis del extracto obtenido. Para ello se recurre generalmente a la centrifugación

de la muestra, aunque en ocasiones se emplea un agente demulsificador [166].

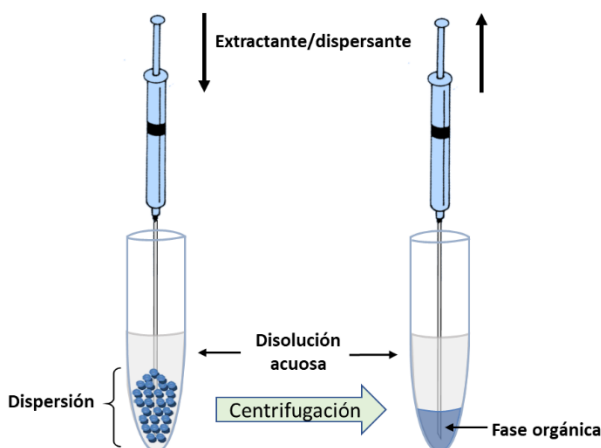


Figura 26. Representación de la DLLME manual.

Los primeros trabajos de automatización de la DLLME basada en técnicas de flujo empleaban sistemas SIA [167,168]. Para ello, se lleva a cabo la inyección de la mezcla extractante-dispersante en forma de pequeñas gotas en el flujo de la muestra empleando una confluencia de los tubos correspondientes, para posteriormente separar las fases por medio de un material adsorbente hidrofóbico que retiene las gotas de extractante en el interior de una columna. Este tipo de configuración requiere etapas adicionales como la elución del extracto de dicho sorbente, así como su posterior limpieza. De este modo se automatizan todas las etapas del proceso, evitando así la centrifugación de la muestra característica del método manual. Sin embargo, presentan algunas desventajas como son la dilución del extracto al eluirlo del

sorbente, junto con los problemas de sobrepresiones que suelen provocar este tipo de columnas.

Como alternativa a los sistemas de flujo, surge el uso de sistemas basados en el uso de un automuestreador y la emulación del proceso manual de DLLME, lo que sistemas se conoce como sistemas *batch* [169]. Para ello se suelen usar muestreadores provistos de posiciones activas que permitan el uso de agitación magnética o tipo vortex, calentamiento, etc., para favorecer la etapa de mezclado y emulsión. En estos sistemas, la jeringa del automuestreador inyecta de forma secuencial la muestra y los reactivos (extractante, disolventes o soluciones salinas rompedoras de la emulsión, etc.), para posteriormente recoger el extracto e inyectarlo en el sistema de detección, generalmente un sistema cromatográfico. Sin embargo, estas técnicas no son muy explotadas debido a los grandes costes asociados a la adaptación del automuestreador y de los viales de muestra, los cuales requieren formas especiales en el cuello o el fondo que faciliten la recolección de los pequeños volúmenes de extracto sin contaminación de la fase acuosa. Además, requieren generalmente de tiempos largos asociados al uso repetido de la jeringa y su correspondiente limpieza, así como a las etapas de separación de fases. Al margen de los costes, los sistemas “batch” están muy orientados al uso de sistemas cromatográficos [170–172].

De la combinación de los anteriores, surgen los sistemas *Flow-batch analysis* (FBA) [169], un híbrido entre la emulación del modo manual en viales y la automatización en flujo. Estos sistemas se caracterizan por emplear una cámara donde se produce la extracción

y/o separación de fases a flujo parado. Dichas cámaras suelen ser viales o tubos (generalmente de polipropileno o vidrio), o bien en ciertos sistemas, puede ser la propia jeringa del sistema de propulsión (sistemas *Lab-in-Syringe*, LIS) [41]. En estos sistemas, en ocasiones se puede evitar el uso de estos disolventes adicionales empleando como agente dispersante agitación magnética [173] o una corriente de burbujas de aire [174,175], aunque pueden emplearse otros gases como CO₂ [176] (generado “in situ” en la propia cámara de extracción mediante la reacción de carbonato sódico y ácido acético) o nitrógeno [177]. Sin embargo, la separación de las fases suele ser pasiva (por acción de la gravedad). En cuanto a la detección, se puede realizar en la propia cámara de mezclado o mediante la inserción del extracto a través del sistema de flujo en el detector. Al estar basados en sistemas en flujo, son compatibles con todo tipo de detectores y no están limitados a su acoplamiento a cromatografía. Aunque está más extendido su uso en sistemas SIA [138,178], incluyendo los sistemas LIS [179,180], se han descrito sistemas de este tipo basados en otro tipo de técnicas de flujo tales como MCFIA [74], LOV [181] o MPFS [33].

Las ventajas principales de los sistemas FBA frente a la dispersión en tubos propia de los sistemas en flujo son la posibilidad de tratar grandes volúmenes de muestra y la posibilidad de conseguir mezclas más homogéneas en menor tiempo, junto con la flexibilidad que ofrece la emulación de sistemas multipaso en una cámara independiente.

En la presente Memoria de Investigación, se recoge un método basado en este tipo de técnicas aplicado a la extracción y análisis de la

vitamina B1 en preparados farmacéuticos, empleando un sistema SIA como sistema de flujo. El sistema está compuesto por dos jeringas independientes y una válvula multiposición, junto con un vial cónico tipo eppendorf de polipropileno que actúa como cámara de extracción y separación. Dicha configuración puede observarse en la Figura 27.

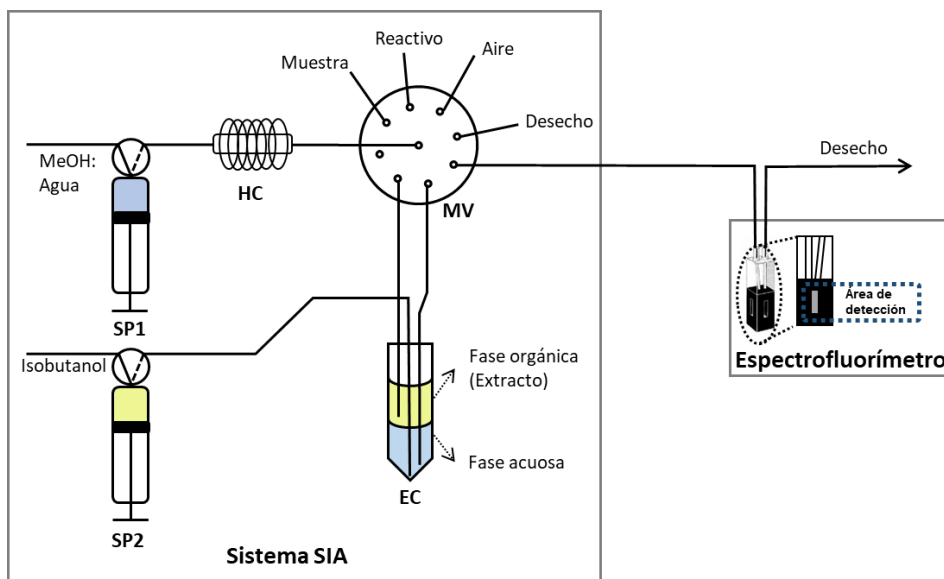


Figura 27. Configuración del sistema SIA. SP: jeringas 1 y 2; HC: Bucle de reacción; MV: válvula multiposición; EC: cámara de extracción (vial eppendorf 2 mL).

En dicho sistema se produce la extracción del analito mediante la mezcla de la muestra (en disolución acuosa y previamente derivatizada), con el disolvente de extracción (en este caso isobutanol) directamente en la cámara de extracción. Se emplea aire como agente dispersante, el cual se introduce a través de la válvula multiposición. Se espera un tiempo determinado para permitir la separación de las fases mediante acción de la gravedad, para posteriormente recoger el extracto por medio de un tubo independiente conectado a la misma

válvula multiposición. El extracto es llevado al detector por medio de una disolución de metanol al 30%, que actúa como portador.

3.2.2. Extracción en fase sólida (SPE)

La SPE se basa en la retención de los analitos en disolución sobre un sólido adsorbente apropiado (también llamado fase sólida o soporte sólido), para después ser eluidos mediante el uso de un disolvente adecuado. Frente a la LLE, la principal ventaja de la SPE es su menor consumo de disolventes orgánicos y su alta selectividad, pues mediante la correcta selección del sólido adsorbente y del disolvente, esta técnica permite aislar, purificar y preconcentrar el analito de forma más eficiente.

En general, la SPE manual se lleva a cabo en cuatro etapas (Figura 28) [182]: (1) acondicionamiento de la fase sólida o sorbente seleccionado, normalmente empaquetada en un cartucho o jeringa, empleando un disolvente adecuado; (2) carga de la disolución de muestra en el cartucho, quedando retenidas en la fase sólida el analito y/o las especies interferentes presentes en la muestra; (3) lavado de la fase sólida con un disolvente apropiado capaz de arrastrar los interferentes sin eluir el analito; (4) elución del analito con un disolvente con gran afinidad por el mismo, siendo capaz de “liberarlo” de la fase sólida.

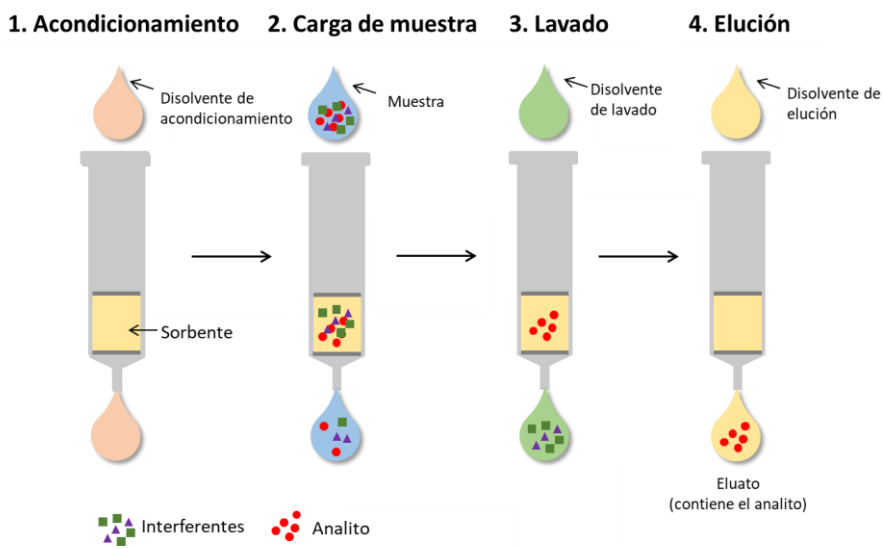


Figura 28. Esquema representativo de las etapas de la SPE clásica.

La correcta optimización de estas etapas permite obtener altos factores de enriquecimiento mediante el uso de pequeñas cantidades de disolvente de elución frente a mayores volúmenes de muestra, así como la selección del material adsorbente permite una alta selectividad. Ambos factores hacen que la SPE sea una de las técnicas de tratamiento de muestra más extendidas a día de hoy.

Las fases sólidas pueden ser muy variadas dependiendo del tipo de analito, seleccionándose la más adecuada en función de su estructura química o polaridad [183]:

- *Sorbentes basados en gel de sílice.*

Son los más comunes, constituidos por partículas esféricas con un tamaño de poro de hasta 120 Å, lo que proporciona una gran superficie de contacto para una mayor capacidad de retención. Su superficie puede ser fácilmente modificada para obtener

diferentes propiedades químicas, mediante la inclusión de diferentes grupos funcionales (aminas, ácidos carboxílicos, etc.) que aportan diferentes grados de polaridad y capacidades de retención aplicables a un amplio rango de analitos: la inclusión de cadenas alifáticas (normalmente C₁₈) proporciona un carácter hidrófobo a la fase sólida, siendo apropiada para la retención de compuestos hidrófobos o de compuestos orgánicos de matrices acuosas [184,185]; la inclusión de otros grupos funcionales, como los iones derivados del ácido bencenosulfónico (SCX) o la timetilamina (SAX), permite su aplicación a compuestos catiónicos y aniónicos, respectivamente. Su principal limitación es su inestabilidad a pH básico, siendo su rango adecuado de trabajo entre 2 y 7.5.

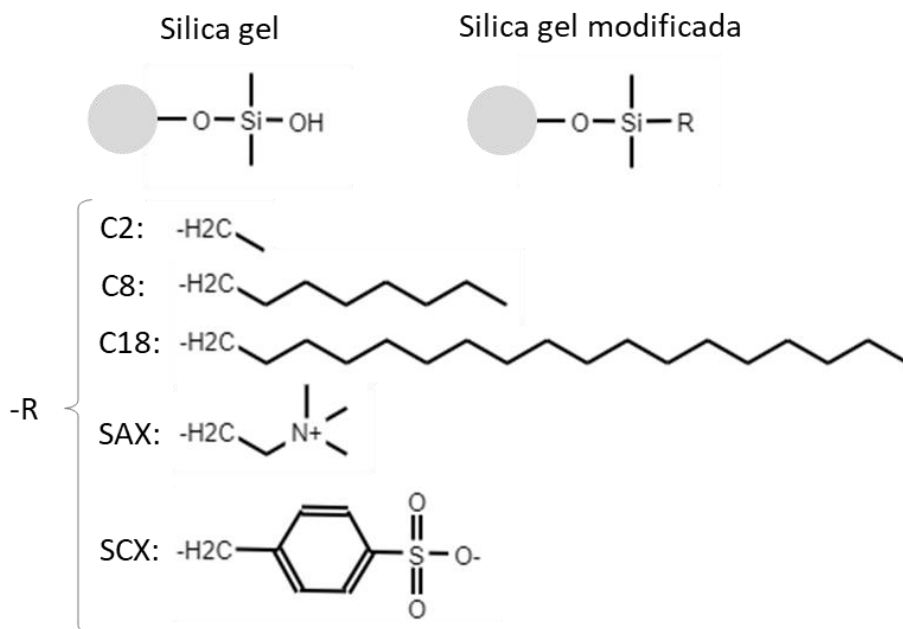


Figura 29. Estructura de los adsorbentes basados en sílica gel más utilizados.

- *Sorbentes poliméricos.*

La mayoría de ellos se basan en poli(estireno-divinilbenceno), material hidrófobo que también puede ser modificado químicamente con grupos ácidos o amino para su aplicación a analitos ácidos y básicos. Este tipo de materiales son aplicables a un rango más amplio de pH que los de sílica. Los polímeros derivados de povidexano también son ampliamente conocido y utilizados.

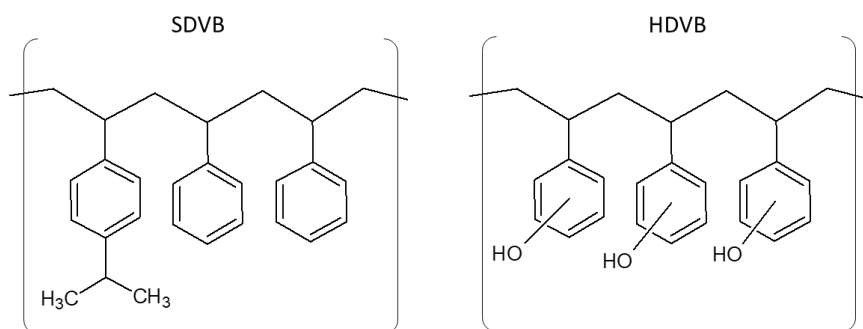


Figura 30. Estructura de los adsorbentes basados en poli(estireno-divinilbenceno) más utilizados.

- *Sorbentes basados en carbón.*

Estos materiales se basan en redes cristalinas de carbono hexagonales que se caracterizan por un alto poder de adsorción, así como una alta resistencia química y térmica. Combinan una gran superficie extractiva con la afinidad por una gran variedad de analitos al poder establecer interacciones dipolo-dipolo, enlaces por puentes de hidrogeno, interacciones π - π o interacciones hidrofóbicas. Los más extendidos, debido a su amplia disponibilidad comercial, son los de carbón grafitizado,

compuestos por partículas esféricas de unas 30 μm , formadas por láminas de carbono hexagonal. Son especialmente adecuados para la retención de compuestos muy polares, aunque no son muy populares debido a que en ocasiones proporcionan una retención excesiva o incluso irreversible con algunos analitos.

Con el auge de los nanomateriales, cada vez más extendidos, resurge el interés por los materiales basados en nanopartículas de carbono; especialmente en nanotubos de carbono (CNTs) [186]: láminas de grafeno enrolladas en forma de cilindro con un diámetro del orden de nanómetros. Existen dos tipos, los de pared simple (single-walled nanotubes-SWNT) y de pared múltiple (*multi-walled nanotubes*, MWNT), cuya estructura se puede apreciar en la Figura 31.

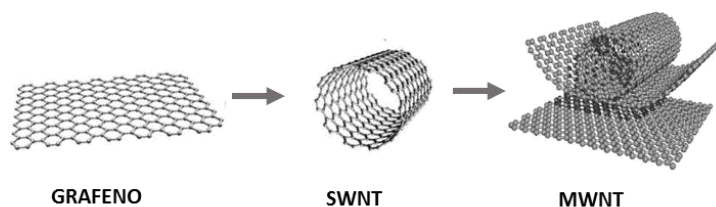


Figura 31. Estructura de nanotubos de carbono a partir de lámina de grafeno.

Estas estructuras además son susceptibles de funcionalización por un tratamiento oxidativo ácido (mezcla nítrico-sulfúrico) de los CNTs puros, principalmente los de capa múltiple. El proceso de oxidación ofrece una mayor cantidad de grupos funcionales que contienen oxígeno (grupos carboxílicos e hidroxilos), pero también una estructura de superficie más hidrófila, lo que hace que los ox-MWCNTs sean más hidrófilos y adecuados para la sorción de

compuestos moderadamente polares [187] o incluso especiación de compuestos metálicos [188]. La ventaja de estos sorbentes reside en que poseen un alto poder de enriquecimiento y un menor efecto matriz que permite utilizar menos cantidad que cuando se emplea, por ejemplo, gel de sílice C₁₈.

- *Polímeros de impresión molecular (MIPs, “Molecularly Imprinted Polymers”)*

La tecnología de impresión molecular [189] está fundamentada en la síntesis de polímeros altamente entrecruzados con propiedades de reconocimiento molecular selectivo hacia los compuestos para los cuales fueron generados. En este proceso, unos monómeros funcionales y un agente entrecruzante copolimerizan en presencia del analito (molécula impresora o plantilla), que actúa como molde en el seno de un disolvente adecuado. La eliminación posterior de la molécula impresora deja unos sitios de unión que son complementarios (en tamaño, forma, orientación y funcionalidad química) al analito que fue empleado como plantilla y contribuyen al reconocimiento molecular del mismo (Figura 32).

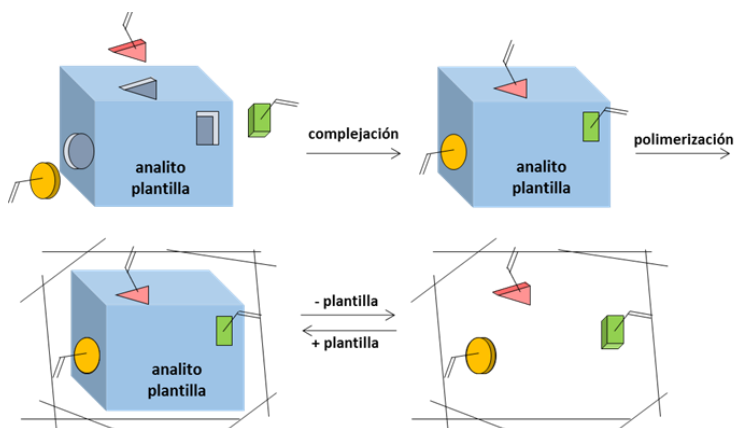


Figura 32. Esquema de síntesis de un MIP

Los MIPs actúan pues como receptores sintéticos capaces de imitar los procesos de reconocimiento molecular llevados a cabo por moléculas biológicas como los anticuerpos. Además, los MIPs son muy estables y pueden ser regenerados tras la retención del analito. Por tanto, son muy atractivos como sorbente para SPE debido a su elevada selectividad. Son especialmente interesantes para su uso en muestras y analitos de carácter biológico, ya que ofrecen una mayor estabilidad en un amplio rango de pH y temperaturas de trabajo, así como una mayor resistencia a disolventes frente a los receptores naturales [190].

- *Materiales magnéticos*

Otro tipo de materiales empleados para la SPE son los materiales magnéticos, constituidos generalmente por nanopartículas (1-100 nm) cuya dispersión en la muestra y retirada de la misma puede controlarse fácilmente con un imán. Los más comunes son derivados del óxido de hierro (como Fe_3O_4 , MnFe_2O_4 y CoFe_2O_4), aplicados al análisis de iones, estrógenos y surfactantes [182]. Estas nanopartículas magnéticas (MNPs) presentan generalmente poca especificidad por el analito y tiende a agregarse, por lo que suelen ser sometidas a procesos de modificación en su superficie: la nanopartícula o *núcleo* es recubierta con un material adecuado o *cáscara*, que su vez puede ser funcionalizada con un compuesto específico o *cubierta final* [191]. De este modo se consigue mejorar su comportamiento en suspensión, el rango de pH de trabajo, su interacción con la matriz o su especificidad por el analito. En la

Figura 33 se resumen algunos de los recubrimientos y grupos funcionales que se suelen emplear en estas nanopartículas.

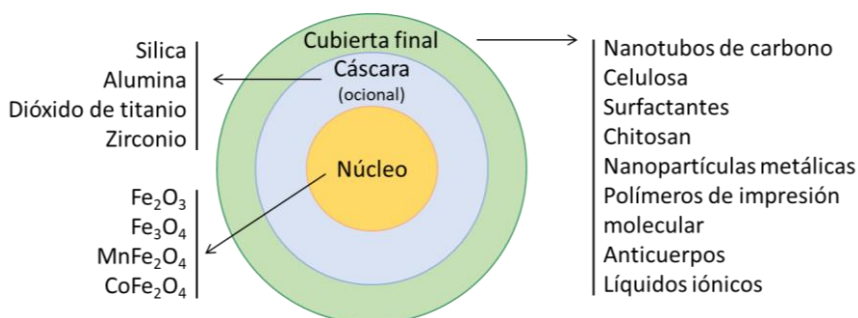


Figura 33. Esquema de de una MNP funcionalizada.

- *Biosorbentes*

Estos materiales se emplean para la determinación y especiación de metales, y se obtienen normalmente a partir de semillas o microorganismos como bacterias, algas u hongos [192]. Se pueden emplear en su forma natural o mediante modificaciones en su superficie para mejorar su selectividad y eficiencia de adsorción [193].

Como ocurría con la LLE, en las técnicas de SPE también se tiende cada vez más a la miniaturización y la automatización. Incorporando la SPE en los sistemas de flujo se obtienen diversos beneficios en comparación con los métodos manuales [130]:

- ✓ Elevada frecuencia de muestreo.
- ✓ Reducción del consumo de reactivos y disolventes.
- ✓ Minimización de la contaminación de la muestra.

- ✓ Obtención de límites de detección y cuantificación más bajos.
- ✓ Capacidad de programación y acoplamiento con diferentes sistemas de detección.

SPE clásica

La forma más común y sencilla de automatizar la SPE es mediante la inserción del soporte sólido en el interior de mini-columnas o discos que se introducen directamente en el sistema de flujo, generalmente antes del detector [194]. En los extremos de la mini-columna se sitúan unas fritas de un material poroso (o simplemente lana de vidrio) para evitar la pérdida de fase sólida, así como los hinchamientos y la falta de homogeneidad de la misma. Su funcionamiento se basa en el paso de la muestra en disolución a través de la columna para la retención de los analitos, para posteriormente proceder a su elución.

Esta técnica se implementa fácilmente en cualquier sistema de flujo y es aplicable a la mayoría de tipos de sorbentes, como sorbentes quelantes [195,196], biosorbentes [197] o resinas de cambio iónico [197]; aunque los más utilizados para compuestos orgánicos son las sílices enlazadas como el gel de sílice C₁₈ [184,185]. Sin embargo, debido a que los sistemas de flujo generalmente trabajan a baja presión (<100 psi), los materiales empleados como sorbentes deben ser suficientemente porosos y tener un tamaño de partícula relativamente grande. Estos factores determinarán la cantidad de fase sólida que se puede introducir en el sistema sin producir sobrepresiones [182].

Una ventaja adicional de esta técnica es la posibilidad de separar los analitos durante la elución. Esto es posible siempre y cuando existan diferencias en el grado de afinidad por el soporte sólido y la cantidad de este sea suficiente para conseguir diferentes grados de adsorción. Sin embargo, la cantidad de fase sólida que se puede introducir en el sistema es limitada por la presión que es capaz de soportar el sistema de inserción, con lo cual sólo es aplicable a la separación de unos pocos analitos [198–200].

Un sistema más novedoso y menos explotado consiste en sustituir la mini-columna por la inserción de una cantidad adicional de soporte sólido directamente en la célula de flujo de un optosensor, en una cantidad suficiente que permita separar los analitos [201]. En la Figura 34 se muestra un esquema comparativo del uso de una minicolumna o un optosensor para automatizar la SPE.

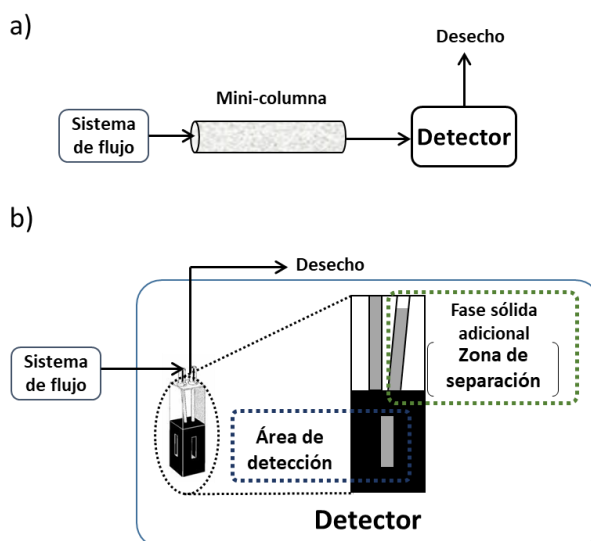


Figura 34. Esquema representativo de la automatización de la SPE mediante a) el uso de mini-columnas y b) optosensores.

De este modo se lleva a cabo la separación y detección de los analitos secuencialmente, minimizando el uso de soporte sólido y de reactivos y disolventes. Es por ello que el uso de sensores ópticos es considerado como un tipo de SPE [182]. En la presente Tesis Doctoral se han desarrollado dos optosensores mejorados capaces de separar hasta 4 analitos, por lo que profundizaremos en ellos más adelante.

En este apartado se puede incluir el uso de columnas monolíticas, cuyo funcionamiento es similar al de las mini-columnas, pero aportan una alta capacidad de separación comparable a las separaciones cromatográficas. Las columnas monolíticas están constituidas por una única pieza de materia porosa, generalmente sílica enlazada con grupos octadecilo o ciano [182]. Son capaces de trabajar a bajas y medias presiones, por lo que se han implementado con éxito en sistemas de flujo como SIA [202], FIA [203], MSFIA [204] o sistemas multiconmutados [205].

Microextracción en fase sólida (SPME)

Esta técnica fue introducida en 1990 por Arthur y Pawliszyn [206]. Consiste en la inserción de una fibra recubierta por un sorbente adecuado en la aguja de una jeringa. La interacción con la muestra puede producirse por inmersión directa (DI-SPME, *Direct immersion Solid phase microextraction*) o en espacio de cabeza (HS-SPME, *Head space Solid phase microextraction*), siendo esta última sólo aplicable a analitos volátiles [207]. Debido a sus características, su automatización suele ir asociada a la cromatografía de gases, donde los analitos adsorbidos se liberan térmicamente en el inyector [208–210]. Es una técnica de

preconcentración muy interesante en este campo, ya que los pequeños volúmenes de inyección en GC (1-12 μL) suelen dificultar su sensibilidad.

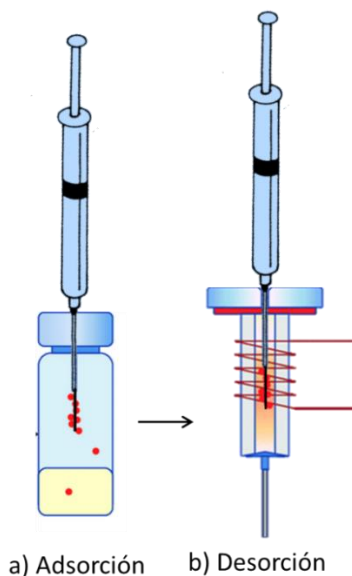


Figura 35. Esquema representativo de las etapas en HS-SPME: a) adsorción del analito sobre la fibra y b) desorción térmica en el inyector

Con el tiempo han surgido nuevas adaptaciones de esta técnica, entre las que destaca la *In-tube SPME* [211], en la que se recubre con el sorbente las paredes internas de un tubo capilar situado generalmente antes del bucle de muestra en la válvula de inyección de un HPLC. Surge como una adaptación de la SPME acoplable a la cromatografía de líquidos para el análisis de compuestos menos volátiles [212].

Microextracción por sorbente empaquetado (MEPS)

Esta técnica se considera una miniaturización de la SPE clásica con cartuchos. Fue descrita por primera vez por Abdel-Rehim [213]

mediante la inserción de unos pocos mg de sólido adsorbente integrada en el interior de una jeringa o en la aguja de la misma (Figura 36). Al aspirar la muestra, los analitos se retienen en el soporte sólido y el resto de la muestra es descartada. Posteriormente, se eluyen los analitos con un disolvente adecuado. Su automatización se logra mediante el automuestreador de un cromatógrafo, habiéndose aplicado con éxito tanto en GC [214–217] como en HPLC [218–221].

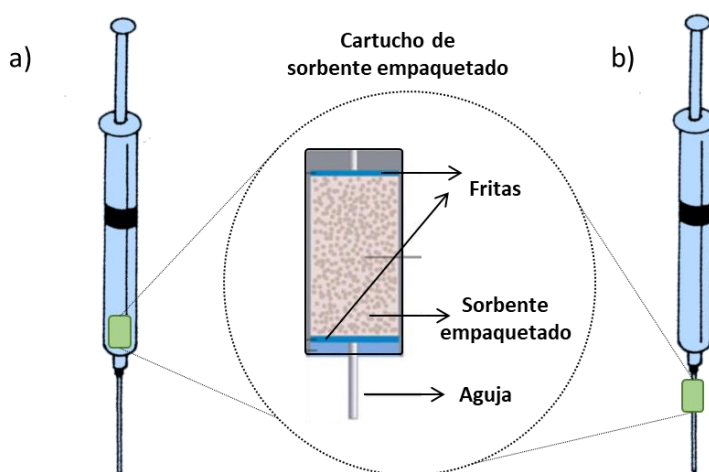


Figura 36. Esquema representativo de las jeringas empleadas en MEPS. Se muestran las posibles ubicaciones del sorbente: a) en el interior de la jeringa, b) Como un inserto entre la jeringa y la aguja.

Extracción en barras de agitación (SBSE)

En este tipo de SPE, el soporte sólido se encuentra recubriendo la superficie de una barra de agitación magnética [207]. La barra se sumerge en la muestra y, mientras se agita, los analitos son retenidos. Posteriormente se retira la barra agitadora de la muestra, se lava y se somete a desorción térmica o química. Su automatización inicialmente

fue aplicada en sistemas cromatográficos, aunque se ha implementado con éxito en sistemas MSFIA [222].

Extracción en fase sólida dispersiva (DSPE)

Se trata de una variación de la SPE en la que el sorbente se añade directamente sobre la muestra en disolución, dónde es dispersado mediante agitación (generalmente mediante agitación manual, aunque puede emplearse vortex o ultrasonidos). Posteriormente, las partículas con el analito retenido son aisladas (generalmente mediante centrifugación) y sometidas a una extracción con un disolvente adecuado [223]. Esta técnica surge en la década de los 2000 como una etapa de limpieza en QuEChERS (de su siglas en inglés *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe*), ideado por Anastassiades para la extracción de pesticidas en frutas y vegetales [224]. La Figura 37 muestra el esquema general de las etapas de la DSPE.

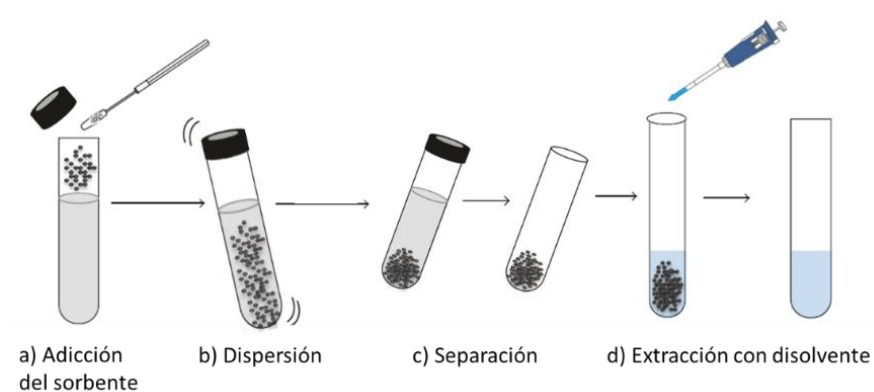


Figura 37. Esquema representativo de las etapas en la DSPE: a) adición del sorbente, b) dispersión del sorbente mediante agitación, c) separación del sorbente (generalmente por decantación mediante centrifugación) y d) extracción con un disolvente adecuado y eliminación del sólido, normalmente por filtración).

De la miniaturización de la DSPE surge la microextracción en fase sólida dispersiva (DSPME) [225], que difiere de su antecesora principalmente en que los volúmenes empleados de fase sólida, disolvente y muestra son significativamente inferiores. Esto es posible gracias al uso de sorbentes con una mayor superficie activa y capacidad de adsorción.

La automatización de la DSPME se consigue mediante su aplicación en sistemas de flujo. Esto se lleva a cabo mediante la inserción de una pequeña cantidad de fase sólida en el interior de una columna o un reactor con filtros en sus extremos, a través del cual se introduce un flujo de líquido para conseguir la fluidificación de las partículas; o bien mediante el uso de una cámara abierta en la que la suspensión de las partículas se realiza mediante una corriente de aire (Figura 38) [226]. Esta metodología minimiza los inconvenientes inherentes a las columnas empaquetadas, como la formación de canales preferentes, sobrepresiones o la expansión o compresión de las partículas. La implementación de estas técnicas se ha llevado a cabo con éxito en sistemas FIA, SIA o MP [82,217,227,228].

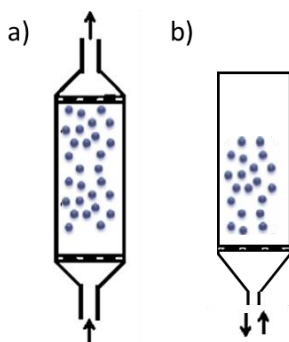


Figura 38. Esquema de las dos formas de fluidificación de las partículas de fase sólida; a) minicolumna y b) reactor abierto. Las flechas representan el sentido del flujo.

3.3. Optosensores en flujo continuo

Los optosensores en flujo continuo surgen de la evolución y automatización de la Espectroscopía en Fase Sólida (*Solid Phase Spectroscopy*, SPS), la cual a su vez procede de la aplicación al análisis cuantitativo del fundamento de los “*resin spot tests*” (ensayos a la gota sobre resinas intercambiadoras de iones). Esta técnica, propuesta por Fujimoto en la década de los 50 [229,230], consiste en la determinación cualitativa de un analito (en forma de ion), mediante observación visual, cuando se aplica un pequeño volumen de muestra sobre unos granos de resina de cambio iónico (que actúa como soporte sólido), produciéndose un cambio de color en presencia del analito y los reactivos adecuados. Sin embargo, no fue hasta la década de los 70 cuando aparecieron los primeros trabajos que empleaban esta técnica para cuantificar el analito [231] mediante la medición instrumental de la absorbancia. Esta técnica, bautizada inicialmente por su autor Yoshimura como “*Colorimetría de Cambio Iónico*”, es lo que actualmente se conoce como “*Espectroscopía en fase sólida*” (SPS).

En la SPS se pone en contacto la muestra con una pequeña cantidad de un soporte sólido adecuado, capaz de interactuar con el analito (o con su producto de reacción) y retenerlo. Una vez retenido, se filtra el soporte sólido para eliminar la disolución de muestra, consiguiendo así la preconcentración del analito. Finalmente, se introduce la fase sólida en una cubeta de medida (generalmente de 1 mm de paso óptico) donde se lleva a cabo la detección espectroscópica.

La SPS presenta una gran ventaja frente a la espectroscopía

convencional: se consigue una mayor sensibilidad, pudiendo aplicarse al análisis de elementos traza sin la necesidad de realizar pasos previos de preconcentración. Además, mediante la selección de la fase sólida adecuada, se puede conseguir una elevada selectividad comparable a la proporcionada por la SPE, pero con la ventaja de eliminar los pasos de elución del analito, lo que supone un menor consumo de disolventes orgánicos, así como una mayor simplicidad de la técnica y un menor coste del instrumental requerido.

Inicialmente, la técnica se aplicó al análisis cuantitativo mediante espectroscopía UV-Visible [232–235], ampliándose el abanico de posibilidades cuando se introdujo la espectrofluorimetría como método de detección [236,237].

Con el auge de la automatización y, más en concreto, de las técnicas de flujo, la SPS evolucionó hacia lo que hoy conocemos como optosensores en flujo o sensores ópticos en flujo (*Flow optosensor*), también conocidos como optosensores en flujo continuo (*Flow-through optosensor*). Estos surgen de la inclusión del soporte sólido en la célula de flujo de un sistema FIA con detección espectroscópica o espectrofluorimétrica. Estos sistemas, descritos por primera vez por Ruzicka y Hansen [238], integran la separación y preconcentración del analito con la detección del mismo.

3.3.1. Propiedades de los optosensores en flujo continuo

En general, un sensor químico (o bioquímico) puede definirse como un dispositivo analítico miniaturizado que responde de manera

directa, reversible, continua, rápida, exacta y precisa a los cambios de concentración de uno o más analitos [239]. Éste consta de una microzona sensora, donde tiene lugar una reacción y/o un proceso de separación, conectada o integrada a un transductor (en el caso de los optosensores, detectores espectroscópicos moleculares no destructivos). En el caso de los optosensores en flujo, estos componentes se integran normalmente en sistemas FIA, SIA, MCFIA o MSFIA, aunque pueden ser aplicados a cualquier sistema de flujo. De este modo, el bolo de muestra es insertado en un flujo portador que lo transporta hasta la zona sensora, donde interacciona con la fase sólida, a la par que se monitoriza la interacción de la radiación con la zona sensora integrada en el área de detección. Este proceso puede observarse en la Figura 39.

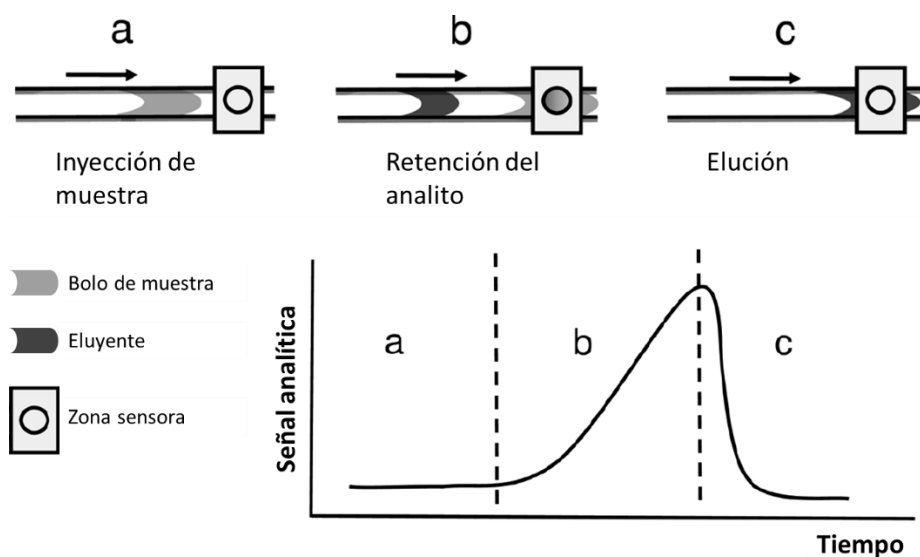


Figura 39: Representación esquemática del proceso de inyección de la muestra en un sensor y la monitorización de su correspondiente señal analítica.

Independientemente del sistema de flujo o de la técnica de detección empleada, los optosensores en flujo continuo presentan una serie de propiedades y ventajas comunes:

- ✓ Elevada exactitud y precisión, características de los sistemas de flujo.
- ✓ Alta sensibilidad, gracias a la preconcentración del analito en la fase sólida. Además, las medidas se realizan antes de la elución del analito, evitando fenómenos de dilución.
- ✓ Selectividad mejorada mediante la elección de un soporte sólido lo más afín posible al analito. A esto contribuye además la eliminación de la mayoría de los posibles interferentes presentes en la muestra gracias a las diferentes afinidades por el soporte sólido.
- ✓ Reversibilidad del proceso de retención, lo cual hace posible la regeneración y reutilización del soporte sólido.
- ✓ Menor consumo de disolventes y reactivos frente a los procesos manuales de preconcentración.
- ✓ Rapidez de respuesta del detector, que permite la monitorización de la señal en tiempo real.

3.3.2. Componentes de los optosensores en flujo continuo

Debido a que los optosensores en flujo surgen de la combinación de un sistema de flujo con la SPS, los componentes de este tipo de sistemas serán los propios del sistema de flujo seleccionado (FIA, SIA,

MCFIA, etc), a los cuales se suma la presencia del soporte sólido en la célula de flujo, donde se llevan a cabo las medidas espectroscópicas. Por lo tanto, en este apartado nos centraremos en el soporte sólido como componente principal de los optosensores en flujo.

El soporte sólido es el elemento más importante en este tipo de sensores. El material seleccionado debe cumplir los siguientes requisitos [240]:

- *Aspectos termodinámicos del proceso de retención.* Por un lado, el coeficiente de distribución del analito entre el sólido y el líquido ha de favorecer la retención. Por ello, materiales no polares se emplean para la retención de analitos hidrófobos, así como las fases sólidas más polares son útiles para retener especie hidrófilas; resinas de intercambio iónico para especies cargadas, etc. Por otro lado, en los casos en los que ocurre una reacción en la superficie de la fase sólida, deben tenerse en cuenta las constantes de equilibrio y las condiciones de reacción.
- *Selectividad:* el soporte sólido debe ser capaz de separar el analito de las especies interferentes presentes en la muestra. Lo ideal sería disponer de un soporte sólido altamente específico para cada analito, aunque esta selectividad también puede conseguirse mediante la derivatización del analito, ya sea previamente a la retención del mismo o mediante la inmovilización de un reactivo derivatizante específico sobre la propia fase sólida. Otras formas de conseguir esta separación se basan en el control de las condiciones del medio (pH por ejemplo) o de las condiciones de elución, que

permitan separar especies con diferentes cinéticas de retención.

- *Aspectos cinéticos*: la cinética de adsorción/desorción del analito debe ser compatible con los cortos tiempos exigidos por las metodologías de flujo.
- *Reversibilidad*. La fase sólida debe poderse regenerar fácilmente tras el análisis de una muestra. Cuando las interacciones entre la especie de interés y la fase sólida son muy fuertes, se hace muy difícil la regeneración de ésta mediante el propio portador o un eluyente adicional (sensores reutilizables). Este inconveniente se puede resolver utilizando la metodología de Inyección de Partículas (*Bead injection*) junto con un sistema SIA introducida por Ruzicka y Scampavia [241], que consiste en reemplazar el soporte sólido tras cada inyección de muestra.
- *Estabilidad del soporte sólido*. La fase sólida debe ser estable a las condiciones del sistema, tales como reactivos, cambios de pH, radiación, etc.
- *Compatibilidad con el sistema de detección*. En los sensores fotométricos, la fase sólida seleccionada debe proporcionar una absorción o dispersión de la radiación incidente suficientemente baja, de modo que permitan realizar las medidas sin saturar el detector.
- *Tamaño de partícula adecuado y cantidad de soporte sólido*. El tamaño de partícula y su grado de empaquetamiento generalmente limita el flujo del sistema que puede ser aplicado.

Igualmente, la cantidad de soporte sólido debe ser óptima, permitiendo la retención necesaria sin contribuir a elevar la presión del sistema debido a un exceso de soporte sólido.

Los principales tipos de fase sólida fueron descritos en el apartado “3.2.2. Extracción en fase sólida (SPE)”. De todas ellas, se selecciona la fase sólida más adecuada en función de la naturaleza de las sustancias que se pretende retener. Generalmente, para interacciones de tipo iónico, las resinas tipo Dowex y los geles Sephadex (QAE A-25, CM C-25 y SP C-25) son las más utilizadas. Los polímeros adsorbentes no iónicos o resinas sin grupos funcionales (Amberlita XAD, Chelex 100, Sephadex G-15) y el gel de sílice C₁₈ (adsorbente no polar de carácter hidrofóbico) son adecuados para interacciones de tipo adsorptivo. De entre ellos, el gel de sílice C₁₈ (material empleado en los sensores desarrollados en los trabajos que recoge esta Memoria de Investigación) es uno de los soportes sólidos más utilizados para la retención de compuestos orgánicos, ya que proporciona una retención adecuada en medio acuoso o hidro-orgánico, permitiendo la fácil elución de los analitos aumentando el porcentaje de disolvente orgánico del medio. No obstante, hay que tener en cuenta que son menos selectivos que los cambiadores iónicos. Otros soportes sólidos que están siendo utilizados como fases sensoras por su alta selectividad son los polímeros de impresión molecular (MIPS).

Las células de flujo son otro elemento clave en el diseño de optosensores en flujo. Su diseño debe permitir la concentración del producto de interés sobre el soporte en un área de la célula tan pequeña como sea posible, siendo esta zona donde debe incidir el haz

de luz (sin irradiar las proximidades de la zona citada, en las que se encuentra la interfase fase sólida-disolución). En la Figura 40 se muestran algunas de las células de flujo más empleadas en optosensores en flujo. En los trabajos desarrollados en esta Tesis Doctoral, se empleó una célula de cuarzo con forma de prisma rectangular de base cuadrada, por cuyo interior circula el flujo a través de un canal en forma de U con un paso óptico de 1.5 mL y un volumen interno de 25 μ L. Este diseño es apropiado para medidas de fluorescencia, ya que permite la medida de la luz emitida a 90° respecto al haz de luz de excitación (Figura 40.B).

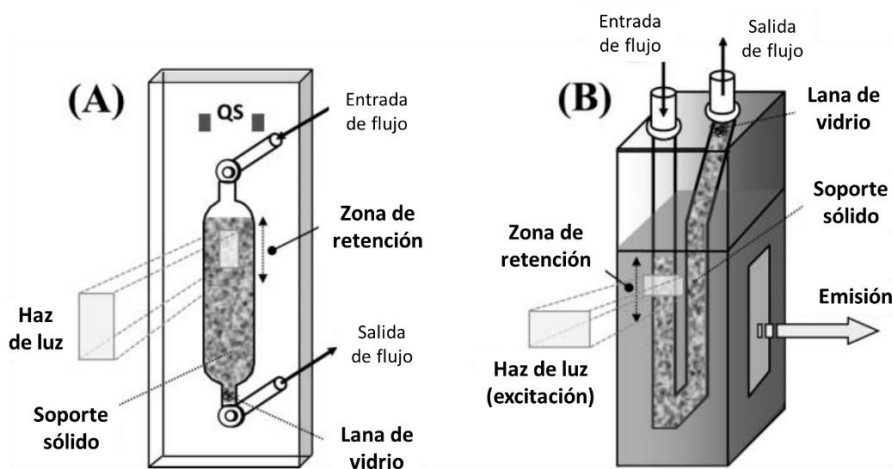


Figura 40: Células de flujo típicas empleadas en optosensores en flujo. A) Célula para la medida espectrofotométrica de la absorbancia UV-VIS (Hellma 138-QS); B) Célula para la medida espectrofluorimétrica (Hellma 172.052-QS).

En la imagen se aprecia como la cantidad de soporte sólido es la mínima para cubrir la zona irradiada, quedando siempre el haz de luz en la zona del soporte sólido. De hecho, el nivel de sólido en la célula es una variable clave: alturas crecientes a partir de este límite originan la

fijación de la especie de interés por encima del haz de luz (fuera de la zona de detección), o bien una dispersión del bolo de muestra a lo largo de una mayor cantidad de sólido, con pérdida de sensibilidad y disminución de frecuencia de muestreo; niveles más bajos del indicado producen, por su parte, una disminución de la señal, pues la luz pasa total o parcialmente a través del flujo de solución.

3.3.4. Clasificación de los optosensores en función del número de analitos

Los optosensores se pueden clasificar en función del número de analitos que se pueden determinar en un mismo análisis [201]: optosensores monoparámetro o monoparamétricos; y optosensores multiparámetro o multiparamétricos.

En los optosensores monoparámetro se determina un solo analito. Desde su aparición, son ampliamente utilizados en sistemas FIA [242–245], SIA [71,246,247] y MCFIA [248–251]. Su principal función en estos sistemas es el aumento de la sensibilidad mediante la preconcentración del analito.

En los optosensores multiparámetro se determina más de un analito en una sola inyección. Esto puede llevarse a cabo mediante tres estrategias diferentes:

1. Mediante el empleo de una minicolumna de separación como etapa previa a la detección de los analitos. Esta precolumna contiene un soporte sólido adecuado que permite la separación de

- los compuestos de interés gracias a sus diferentes grados de interacción con el sorbente empleado. Se trata por tanto de la combinación de los optosensores con la SPE automatizada en columna (tal y como se expuso en el apartado correspondiente). Desde su aparición en 2001 [200], su aplicación se ha llevado a cabo principalmente en sistemas FIA y MCFIA, para la separación de mezclas de analitos binarias [252–254] o ternarias [199,255,256].
2. Uso de una cantidad adicional de soporte sólido en la célula de flujo. Se trata de una estrategia similar a la anterior, pero más simple, ya que evita el uso de dispositivos adicionales. De este modo, la separación tiene lugar en la zona superior de la célula de flujo, produciendo el paso secuencial de los analitos por la zona sensora, integrando de este modo la SPE automatizada y el optosensor en la misma unidad. Este sistema permite un menor consumo de soporte sólido y, en consecuencia, de los disolventes tóxicos asociados a la elución de los analitos. Esta técnica, menos explotada que la anterior, ha sido aplicada hasta la fecha a la separación de mezclas binarias de analitos en sistemas FIA [256] y MCFIA [257]. Sin embargo, en esta Tesis Doctoral se ha desarrollado un optosensor mejorado capaz de separar una mezcla cuaternaria de analitos, empleando para ello un sistema SIA y micropartículas de sílice enlazada C₁₈ como soporte sólido.
 3. Quimiometría. En este caso la estrategia se basa en la aplicación de tratamientos matemáticos y estadísticos sobre los datos y señales analíticas para la cuantificación de distintos analitos, sin necesidad de separarlos [259,260].

3.4. Desarrollo de métodos automáticos: automatización de variables

A la hora de poner a punto un método analítico empleando sistemas automáticos de análisis en flujo, existen una serie de propiedades analíticas a las que se debe prestar atención:

- *Sensibilidad.* En general, los métodos automáticos son algo menos sensibles que las técnicas manuales. Esto es debido a que existe una dispersión física o dilución de la muestra en el portador, evitando que se alcance la máxima señal posible. Además, cuando se hacen reacciones de derivatización, se obtienen rendimientos parciales debido a los cortos tiempos de residencia de analitos y reactivos en el sistema. Otro factor que disminuye la sensibilidad es el paso óptico de las cubetas de flujo, el cual es menor que el de las cubetas típicas manuales. Esto se puede solventar mediante el uso de técnicas de preconcentración *online*, como ocurre por ejemplo con el uso de optosensores, donde se produce la preconcentración del analito en el soporte sólido empleado.
- *Selectividad.* La adaptación de un método convencional para ser llevado a cabo de manera automática conlleva, en general, una reducción más o menos notable tanto del número de especies interferentes, como del nivel de perturbación. El mayor nivel de selectividad logrado se debe en muchos casos a que las reacciones paralelas indeseables no se desarrollan en el corto espacio de tiempo de medida.
- *Precisión.* A pesar de que en este tipo de metodologías concurren

aspectos cinéticos, físicos y químicos, que a priori pueden hacer suponer que los resultados no han de caracterizarse por su buena precisión (modo de inyección, fluctuaciones de la temperatura, cambios en la concentración de reactivo o portador, etc.), se alcanzan niveles de precisión notables y perfectamente comparables con los conseguidos con las metodologías manuales.

- *Rapidez.* Los métodos automáticos se caracterizan por su elevada frecuencia de muestreo en comparación con los métodos manuales. Factores como volumen de muestra, volumen interno del reactor y caudal son decisivos al establecer la velocidad de muestreo. Deben elegirse en cada caso las condiciones adecuadas a las necesidades.
- *Sencillez y versatilidad.* Las técnicas de flujo se caracterizan por su gran simplicidad debido al uso de montajes no sofisticados compuestos por tubos de teflón, conexiones, bifurcaciones, etc., de fácil ensamblaje. Así, es fácil sustituir algún componente, alargar un reactor, modificar la temperatura, etc., para adaptar el mismo montaje a la determinación de diversos analitos en diferentes matrices. Además, los softwares de control de estos sistemas facilitan aún más el manejo y la automatización del sistema.

La optimización del método debe orientarse hacia la mejora de estas propiedades en todos los niveles. En este apartado se describen las distintas variables a optimizar para cumplir este objetivo en los sistemas SIA y MSFIA empleados en el desarrollo de esta Tesis Doctoral.

3.4.1. Variables del sistema de flujo

Debido a las similitudes entre SIA y MSFIA, la optimización de métodos de análisis empleando estos sistemas es muy similar. Existen una serie de parámetros que se pueden optimizar para minimizar la dispersión de la muestra y obtener la máxima señal posible [261]:

- *Volúmenes.* El volumen de inyección determina la cantidad de analito que entra en el sistema y, por lo tanto, influye en la sensibilidad del método. En general, conforme aumenta el volumen de la muestra, aumenta la señal analítica, hasta alcanzar un valor máximo correspondiente a la menor dispersión posible. Pero el volumen de muestra no es el único a optimizar: se tiende a emplear la cantidad mínima de reactivos, disolución portadora, eluyentes, etc. que permitan obtener los resultados deseados sin elevar el consumo de disolventes y reactivos, así como los tiempos de trabajo.
- *Caudales y tiempos.* La velocidad de flujo puede ser determinante cuando en el sistema de flujo se incorporan etapas de tratamiento de muestra. Si el proceso es rápido se originan señales apenas afectadas por el caudal, dentro de los valores permitidos para éste. Sin embargo, cuando la cinética del proceso es lenta, la señal depende fuertemente del caudal, ya que caudales demasiado altos se traducen en tiempos insuficientes de contacto, originando procesos incompletos y señales bajas, lo que conlleva una disminución en la sensibilidad. Por lo tanto, hay que adoptar una solución de compromiso entre sensibilidad y frecuencia de muestreo.
- *Variables del manifold.* Se puede minimizar la dispersión en el sistema,

y por ende aumentar la sensibilidad, mediante una adecuada optimización en el sistema de tubos y conexiones empleados en el sistema. La dispersión del bolo de muestra es directamente proporcional al radio del tubo por el que es desplazado, debido a que con éste aumenta el área de contacto entre la muestra y la disolución portadora. Del mismo modo, la longitud de los tubos empleados afecta a la dispersión, ya que tubos demasiado largos favorecen un mayor tiempo de contacto entre el bolo y el portador, favoreciendo la dilución del analito. Otro factor que influye en la dispersión es la geometría en la disposición de los tubos: cuando se enrolla un tubo, se producen flujos secundarios de carácter radial causados por fuerzas centrípetas que favorecen los procesos de dispersión y mezclado. Por este motivo, en las partes del manifold donde se producen reacciones o procesos de extracción en el interior del tubo, se insertan reactores compuestos por tubos enrollados o anudados que favorezcan altos rendimientos de reacción.

3.4.2. Variables instrumentales del detector

En función del detector empleado, deberemos optimizar una serie de parámetros para conseguir las mejores propiedades analíticas. En todos los trabajos recogidos en la presente Memoria, se ha empleado un detector espectrofluorimétrico. En este tipo de detectores, se pueden conseguir mejoras en la señal por medio de la optimización de las siguientes variables:

- *Longitudes de onda de excitación y emisión.* Mediante la adecuada

selección de las longitudes de onda no solo puede conseguirse la mejor señal analítica posible del analito, sino que es posible minimizar la señal originada por sustancias interferentes, favoreciendo la selectividad del sistema.

- *Anchura de las rendijas de los monocromadores.* Mediante la apertura de rendijas se puede intensificar la señal obtenida no solo por parte del analito, sino también la señal de fondo procedente de la matriz (influenciada por disolventes, interferentes y/o soporte sólido empleado en el caso de optosensores). Por ello es importante estudiar estas variables para obtener una buena relación señal/ruido.
- *Voltaje del tubo fotomultiplicador.* Tiene una influencia similar a la de la anchura de las rendijas, pues al aplicar voltajes más altos conseguiremos señales más intensas, a la par que aumenta la señal de fondo y el ruido en el sistema. Por ello, debe estudiarse este parámetro para conseguir una buena señal en el rango de concentración requerido sin incrementar demasiado la señal de fondo.

3.4.3. Variables químicas

Las variables químicas son aquellas relacionadas con la naturaleza de la muestra, así como del resto de disoluciones y/o reactivos que participen en el proceso.

La naturaleza de la muestra es una variable crítica cuando se

trabaja con sistemas de extracción o separación. El pH tiene una influencia especialmente importante en las especies que poseen comportamiento ácido-base, ya que determina si el analito se encuentra en su forma ionizada o no, permitiendo así la interacción deseada con un determinado soporte sólido o disolvente de extracción. Sin embargo, generalmente carece de efecto significativo cuando el analito no sufre equilibrios protolíticos.

En función de la técnica de tratamiento de muestra que incorpore el método que estemos optimizando, el resto de las variables químicas pueden variar ligeramente, con lo cual las estudiaremos por separado.

Variables del soporte sólido

En los optosensores en flujo continuo, la selección del soporte sólido es una de las etapas más importantes en la optimización del método. Para la elección de este soporte hay que considerar la naturaleza, estructura y propiedades físicas y químicas de los analitos, reactivos o productos de reacción que vayamos a fijar en él, además de la transparencia del mismo en la zona del espectro en la que se trabaje, ya que no debe originarse una línea base demasiado alta.

Como se ha indicado anteriormente, se suelen usar resinas de intercambio iónico cuando el analito (o producto de reacción) presenta un equilibrio ácido-base que permita que pueda estar cargado en un intervalo de pH determinado en función del valor de su pKa. En el caso de que la molécula sea apolar o no presente grupos funcionales que permitan su retención en un intercambiador de iones, se usan soportes

sólidos sin grupos funcionales donde la retención de la especie de interés se lleva a cabo mediante un mecanismo principalmente de adsorción.

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

Una vez seleccionado el soporte sólido se procede a la realización de los espectros de luminiscencia correspondientes al/los analito/s, debiéndose registrar tanto en disolución como retenidos en la fase sólida. La interacción entre el analito y la fase sólida puede desplazar las longitudes de onda de absorción/emisión hacia valores superiores o inferiores, fenómenos conocidos como efecto batocrómico e hipsocrómico, respectivamente. A la hora de realizar esta selección, también ha de estudiarse la señal generada por el propio soporte sólido cuando se analiza un blanco de muestra, ya que ésta determinará el nivel de la línea base, el cual afecta a la señal neta obtenida. Teniendo en cuenta estos aspectos, se seleccionan las longitudes de onda de excitación y emisión óptimas para la medida. A la hora de seleccionar un soporte sólido de entre varios que permiten la retención del analito (o especie de interés) se elegirá aquel que proporcione una mayor señal analítica neta.

El siguiente factor a tener en cuenta en la optimización de un sensor suele ser la cantidad o nivel de soporte sólido que se introduce

en la célula de flujo. En los sensores monoparamétricos, la cantidad de soporte debe cubrir completamente el área irradiada del detector, pues de lo contrario las medidas se harían total o parcialmente en fase líquida, perdiendo tanto selectividad como sensibilidad. Un exceso de soporte sólido es, en general, perjudicial, pues contribuye a una mayor dispersión del bolo de muestra (el analito quedaría retenido por encima del área de detección) y a una pérdida de velocidad de muestreo.

Sin embargo, en los sensores multiparámetro se puede incorporar una cantidad adicional de soporte sólido que cubra la zona previa al área de detección. Esta cantidad adicional puede proporcionar en ciertos casos un grado de discriminación entre especies de la muestra (permitiendo su separación antes de área de detección y, por tanto, su determinación secuencial) o bien separar parte de la matriz del analito, de forma que se incrementa la selectividad en detrimento de una pequeña disminución de sensibilidad.

Otro factor a tener en cuenta a la hora de seleccionar el soporte sólido es su capacidad de regenerarse tras la determinación analítica, permitiendo la medida de una nueva muestra. Llevar a cabo este paso de regeneración es un requisito clave, ya que va a determinar la rapidez, sencillez del montaje, repetitividad, vida media del soporte sólido, etc. Debe optimizarse esta etapa para conseguir el máximo número de análisis sin necesidad de desmontar el sistema para sustituir el soporte sólido.

Dependiendo del tipo de analito y del grado de retención de éste o de los componentes de la muestra sobre el soporte sólido, se optará

por una determinada estrategia para llevar a cabo la elución del analito y la limpieza de la fase sólida:

- Si la propia disolución portadora actúa como eluyente (caso más simple para la regeneración), el proceso de regeneración comienza justo en el momento en el que el extremo posterior del bolo de muestra alcanza el soporte sólido.

La fuerza iónica creciente de la solución portador/eluyente suele actuar disminuyendo la respuesta analítica del sensor en el caso de cambiadores iónicos, pues los iones del eluyente compiten con la especie de interés por su fijación en la zona sensora. Es el procedimiento más sencillo y permite frecuencias de muestreo altas y asegura una mayor duración del soporte cuando éste es una resina de intercambio iónico.

En el caso de fases sólidas que no sean de intercambio iónico, como es el gel de sílice C_{18} , también es posible la regeneración total a través de la disolución portadora mediante la modificación de su polaridad. Por ejemplo, cuando se emplean disoluciones de metanol:agua, cantidades más altas de metanol hacen posible una regeneración más eficaz, pero disminuyen la capacidad de retención de la fase sólida sobre el analito, por lo que este sistema de limpieza y regeneración en principio sólo es aplicable a sensores monoparámetro.

- En los casos en los que no es posible la regeneración del sensor con el propio portador se emplea una solución eluyente adicional, que se hace llegar a la zona sensora mediante la inserción de un

volumen definido en el sistema que permita la recuperación de la línea base. Se consigue una mayor sensibilidad al no haber elución simultánea al proceso de retención, siendo la preconcentración más efectiva. No obstante, el uso de un eluyente da lugar a una menor frecuencia de muestreo y acorta la vida del sensor si el soporte es una resina de intercambio iónico. En el caso de utilizar gel de sílice C₁₈ como soporte sólido suelen emplearse soluciones metanólicas de concentración mayor a la del portador. Esta estrategia es la empleada en los sensores multiparámetro, en los que se aprovechan las diferencias en las cinéticas de retención de los distintos analitos para separarlos mediante el uso de eluyentes de distinto grado de polaridad: se emplea un portador más polar para favorecer una fuerte retención de los analitos más apolares, permitiendo la elución del resto, para posteriormente introducir los eluyentes necesarios (por ejemplo, disoluciones acuosas con una concentración de metanol creciente) que permitan la elución secuencial de los analitos y, posteriormente la limpieza del soporte sólido.

Variables del sistema de LLE

En el caso de los sistemas que incorporan la LLE, los parámetros y variables a optimizar pueden ser muy distintos en función de la técnica de extracción empleada. Por ello, nos centraremos en aquellos que afectan a las técnicas empleadas en los trabajos recogidos en esta Memoria de Investigación.

La etapa más importante en este caso es la selección del

disolvente o disolución extractante más adecuada, que se realiza en función de la naturaleza del analito y de la matriz en la que se encuentra. Cuando el analito se encuentra en una matriz acuosa, se emplean disolventes orgánicos, cuyo grado de polaridad debe ser optimizado para conseguir una buena afinidad por las especies que queremos extraer. Sin embargo, cuando el analito se encuentra inmerso en una matriz apolar, el extractante se compone generalmente de una disolución acuosa o una mezcla de agua con algún disolvente miscible con ella que permita la extracción moderando el grado de polaridad del extractante. Además, cuando el analito es susceptible de ionización, puede mejorarse la extracción mediante el ajuste del pH o la fuerza iónica del extractante o de la muestra.

La disolución encargada de transportar el extracto hacia el detector y su interacción con el mismo afecta a la calidad de la señal analítica obtenida. Esto es especialmente importante en los sistemas SIA, donde la disolución portadora debe ser compatible con dos fases de distinta naturaleza: el extractante y la muestra. Un portador poco afín al extractante puede ocasionar turbidez o aparición de burbujas en la interfase y ocasionar picos irregulares y poco reproducibles, mientras que un portador demasiado afín puede diluir en exceso el extracto y resultar en una pérdida de sensibilidad. Usar mezclas con una polaridad intermedia entre la del extractante y la de la muestra proporciona una solubilidad parcial del extractante, suficiente para evitar los problemas de turbidez sin diluir excesivamente el extracto. Por ejemplo, en uno de los trabajos recogidos en esta Memoria, se emplearon mezclas de metanol-agua como portador en un sistema de extracción con

isobutanol como extractante para matrices acuosas.

En los sistemas MSFIA la optimización del portador suele ser más sencilla, ya que pueden emplearse disoluciones y jeringas diferentes para desplazar la muestra y el portador por el sistema.

El extractante seleccionado debe ser compatible con el sistema de flujo empleado. Cuando se emplean en el sistema dos fases líquidas diferentes, el material de los componentes del sistema debe ser tenido en cuenta, ya que la distinta densidad y afinidad de las fases orgánica y acuosa por dicho material puede ocasionar un desplazamiento irregular de ambas fases y la formación de microgotas o películas de una de las fases en las paredes de los tubos. Esto se traduce en que parte del extracto o la muestra puede quedar retenida en el sistema y contaminar el siguiente análisis, por lo que debe tenerse en cuenta a la hora de optimizar una etapa de limpieza adecuada. El uso de disolventes miscibles con ambas fases puede ser una de las soluciones más simples y eficaces. Sin embargo, cuando las fases son de muy distinta naturaleza, una limpieza dual empleando porciones frescas de extractante y disolvente o portador de muestra suele ser lo más eficaz.

3.5. Los analitos y su determinación

Los analitos seleccionados para el desarrollo de esta Tesis Doctoral son compuestos de interés en los campos agroalimentario y/o farmacológico. Se pueden clasificar en tres grupos diferentes: (a) vitaminas (vitamina B1); (b), pesticidas (carbendazima (CBZ), tiabendazol (TBZ), carbarilo (CB) y o-fenilfenol (OPP)); y (c) aditivos plásticos (4,4'-dihidroxibifenilo (DHBP)). A continuación, se realiza una breve descripción de cada uno de ellos, así como de las técnicas analíticas descritas en bibliografía para su determinación.

3.5.1. Vitaminas

Las vitaminas constituyen un grupo heterogéneo de compuestos orgánicos que actúan como coenzimas en numerosas reacciones metabólicas. Son micronutrientes esenciales para el funcionamiento adecuado del cuerpo humano. Esto significa que el cuerpo no es capaz de sintetizarlos, por lo que deben ser consumidos en la dieta en pequeñas dosis. Tanto su déficit como su exceso en la dieta pueden ocasionar problemas de salud, de ahí la importancia de su control analítico [262].

En función de su solubilidad, las vitaminas se clasifican en dos grandes grupos: vitaminas liposolubles, entre las que se encuentran las vitaminas A, D, E y K; y vitaminas hidrosolubles, constituido por las vitaminas del grupo B y la vitamina C. Todas ellas pueden ser obtenidas en la dieta a partir de fuentes naturales, vegetales o animales. Sin embargo, también pueden ser producidas industrialmente, ya sea por síntesis

química o por fermentación mediante ciertos microorganismos.

La mayor parte de las vitaminas producidas industrialmente se emplean en la fabricación de suplementos vitamínicos y complementos dietéticos de carácter farmacológico. Estos suplementos están regulados a nivel europeo a través de la Directiva 2002/46/CE [263], en la que se definen los complementos alimenticios como aquellos “productos alimenticios cuyo fin sea complementar la dieta normal y consistentes en fuentes concentradas de nutrientes o de otras sustancias que tengan un efecto nutricional o fisiológico, en forma simple o combinada, comercializados en forma dosificada, es decir cápsulas, pastillas, tabletas, píldoras y otras formas similares, bolsitas de polvos, ampollas de líquido, botellas con cuentagotas y otras formas similares de líquidos y polvos que deben tomarse en pequeñas cantidades unitarias”. En esta Directiva se establece que vitaminas y derivados pueden contener estos complementos alimenticios, además de los criterios de pureza, las condiciones de etiquetado y los sistemas de control aplicables a los mismos.

Sin embargo, hoy en día existe una tendencia en los consumidores hacia el rechazo de este tipo de suplementos no naturales, lo que ha ocasionado un aumento de los denominados “alimentos enriquecidos”. El Reglamento No 1925/2006 regula a nivel europeo el enriquecimiento de alimentos mediante la adición de vitaminas y minerales [264].

Debido a la importancia de las vitaminas sobre la salud del organismo, se vuelve imprescindible su análisis cuantitativo, especialmente en alimentos enriquecidos y suplementos alimenticios,

donde los requerimientos del etiquetado exigen un control exhaustivo de las cantidades añadidas en la formulación. La mayoría de las vitaminas pueden encontrarse en diversas formas químicas, muchas de ellas inestables, lo cual dificulta su separación y cuantificación en mezclas complejas. En concreto, las vitaminas hidrosolubles suelen ser química y térmicamente inestables en disolución, especialmente en medios alcalinos, en presencia de iones metálicos y, en ocasiones en presencia de luz. Por ello, la acidificación, precipitación de proteínas, adición de agentes reductores o congelación suelen ser algunas de las técnicas a tener en cuenta a la hora de desarrollar un método de extracción y determinación cuantitativa de vitaminas [265].

Tiamina (Vitamina B1)

La vitamina B1 o tiamina es una vitamina hidrosoluble que juega un papel muy importante en el correcto funcionamiento del sistema nervioso y cardiovascular. Se encuentra de forma natural en legumbres, semillas, cereales y otros productos de origen vegetal, y en sus formas fosforiladas en alimentos de origen animal. En suplementos alimenticios se suele usar el derivado sintético tiamina hidrocloreuro. Se absorbe en el intestino en un 95%, aunque sustancias como el alcohol pueden afectar a su absorción.

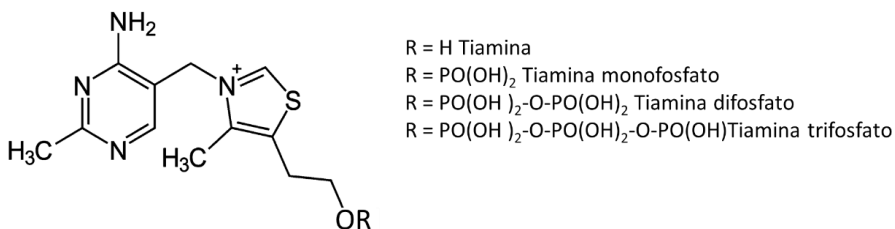


Figura 41: estructura química de la tiamina y sus derivados fosforilados.

Esta vitamina, en su forma de difosfato, es esencial en las reacciones catabólicas de obtención de energía, actuando como coenzima en el metabolismo de los carbohidratos y de aminoácidos de cadena ramificada como la leucina, isoleucina y valina. También actúa como coenzima en reacciones anabólicas, siendo esencial para la producción de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) y del neurotransmisor acetilcolina, entre otros [266].

La Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) establece el requerimiento medio diario de vitamina B1 en 0.1 mg/MJ (0.4 mg/1000 kcal) [266]. El déficit de tiamina provoca diversos desórdenes en los sistemas nervioso y cardiovascular, desencadenando en casos extremos enfermedades como el beriberi, con síntomas como fatiga extrema, insuficiencia cardíaca, olvido, mala coordinación y pérdida de peso; o la encefalopatía de Wernicke, que provoca alteraciones en los movimientos oculares, ataxia y pérdidas de consciencia y puede desencadenar en el síndrome de Korsakoff, caracterizado por episodios de amnesia, desorientación y psicosis [266,267]. No se han descrito efectos adversos de un consumo excesivo de tiamina en la dieta, debido a que se trata de una vitamina hidrosoluble cuyo exceso se excreta fácilmente a través de la orina.

Determinación de tiamina

A la hora de desarrollar un método para la determinación de tiamina, es muy importante tener en cuenta su inestabilidad en disolución. En su forma libre sólo es estable a valores de pH muy ácidos (entre 2 y 4), siendo especialmente lábil al calor y en presencia de

oxígeno en pH alcalinos. En sus formas fosforiladas puede mantenerse estable en disolución a pH entre 2 y 6. Además, también es degradada por acción de la luz ultravioleta [268].

Todos estos factores han de tenerse en cuenta a la hora de desarrollar un método de análisis para la tiamina. De hecho, su alta predisposición a la oxidación en medio alcalino es aprovechada por muchos métodos de análisis, en los cuales se usa un agente oxidante para transformar la tiamina en sus derivados fluorescentes o tiocromos, que pueden ser analizados mediante detectores fluorimétricos. En la Figura 42 se muestra el esquema de reacción de oxidación de la vitamina B1 en presencia de hexacianoferrato (III) de potasio, agente oxidante más comúnmente empleado para este fin.

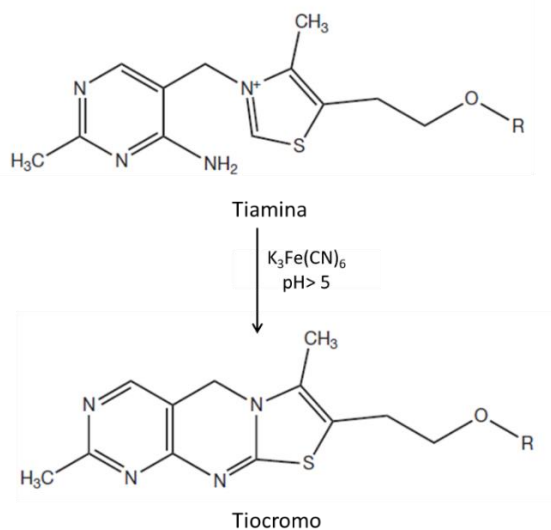


Figura 42. Reacción de oxidación de tiamina a tiocromo.

Para su determinación cuantitativa, los métodos cromatográficos son los más empleados tanto en matrices alimentarias

como en suplementos dietéticos y fluidos biológicos, especialmente cuando se determina junto con otras vitaminas. En concreto, se han descrito numerosos métodos que emplean HPLC con detección espectrofotométrica [269–272] y/o espectrofluorimétrica [273–275], así como con detección mediante espectrometría de masas [276,277]. También se han desarrollado métodos electroquímicos [278,279] y microbiológicos [280].

Sin embargo, son los métodos fluorimétricos los más empleados para el análisis de tiamina, los cuales normalmente van precedidos por la oxidación con hexacianoferrato. Debido a la complejidad de las matrices en las que se suele encontrar, se requieren técnicas de tratamiento de muestra adicionales previamente a la determinación cuantitativa, tales como la extracción en fase sólida mediante MIP [281] o DMSPE [282] o la DLLME [283]. Sin embargo, todos estos métodos son manuales. Se han descrito numerosas metodologías que incluyen el uso de técnicas de flujo con detección fluorimétrica [76,284,285], pero tan sólo uno de ellos describe la implementación de técnicas de extracción en el propio sistema de flujo, en concreto la extracción con disolventes sin separación de fases en un sistema FIA [134].

3.5.2. Pesticidas

Según la definición de la Comisión Europea, el término “pesticida” se refiere a *algo que previene, destruye o controla un organismo dañino (plaga) o enfermedad, o protege las plantas o los productos vegetales durante la producción, el almacenamiento y el*

transporte. En función del tipo de organismo al que van dirigidos, se distinguen los siguientes grupos de pesticidas: herbicidas, fungicidas, insecticidas, acaricidas, nematocidas, molusquicidas, rodenticidas, reguladores del crecimiento, repelentes, etc. [286].

Debido a la necesidad cada vez mayor de emplear la agricultura intensiva y de obtener cultivos más productivos y resistentes, el uso masivo de pesticidas se ha extendido en todas las etapas de la agricultura (producción, almacenamiento, transporte y manipulación). Como consecuencia, estos compuestos pueden encontrarse no sólo en el producto para el que están destinados, sino también en el medio ambiente, contaminando la atmósfera, el suelo o el agua del ecosistema, incorporándose a la cadena alimentaria en distintos niveles [287]. Es por ello que este grupo de contaminantes es uno de los que más preocupa a la población y a las autoridades competentes, las cuales se encargan de evaluar la potencial toxicidad de cada uno de estos compuestos para permitir y controlar su uso.

A nivel Europeo, el reglamento 1107/2009 [288] regula la comercialización de este tipo de productos, mientras que el reglamento 396/2005 [289] y sus correspondientes modificaciones establece los límites máximos de residuos (MRLs) para cada uno de los pesticidas permitidos en todos los alimentos que se destinan al consumo humano o animal, con el fin de proteger la salud. Por otro lado, la EFSA es la encargada de la evaluación de la posible toxicidad y riesgos para la salud que pueden producir cada una de estas sustancias. En base a sus estudios, se aprueba o prohíbe el uso de un pesticida, y se determina o se modifica constantemente su MRL [290].

A nivel internacional, la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) crean el Codex Alimentarius [291] como un conjunto de normas, directrices y prácticas internacionales cuyo objetivo es garantizar el consumo de alimentos inocuos y de calidad a todas las personas en cualquier lugar del mundo. Establece sus propios MRLs como la concentración máxima de residuos permitidos (expresada en mg kg^{-1}) en la superficie o la parte interna de los productos alimenticios.

Carbendazima (CBZ)

La CBZ [(Bencimidazol 2-il carbamato de metilo)] es un fungicida del grupo de los benzimidazoles. Es el principal producto de degradación del benomilo, que en agua se hidroliza rápidamente a carbendazima a pH alcalinos.

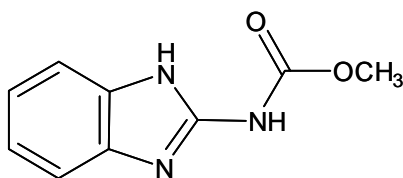


Figura 43. Estructura de la CBZ

La CBZ actúa contra la proliferación de hongos debido a que interfiere en la formación de microtúbulos, por lo que se emplea como fungicida atacando a más de 190 enfermedades causadas por hongos en todo tipo de cultivos, especialmente en frutas, semillas, hortalizas, césped o grandes cultivos en general. Además, presenta también cierta actividad acaricida [292]. Es rápidamente absorbida mediante

exposición oral y por inhalación. Aunque no se acumula en los tejidos, debido a que se excreta en la orina y heces, la exposición repetida tanto a benomilo como a carbendazima se ha relacionado con alteraciones en el sistema reproductivo masculino, efectos adversos en el hígado o con un aumento en el riesgo de sufrir enfermedades como el Parkinson o ciertos tipos de cáncer en mamíferos [292,293].

Tiabendazol (TBZ)

El TBZ [4-(2-Benzimidazolil) tiazol] es un fungicida del grupo de los benzimidazoles.

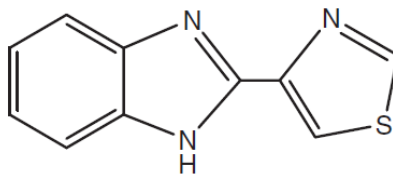


Figura 44. Estructura del TBZ

El uso más extendido del TBZ es como fungicida para el control del moho verde en los cultivos de naranjas, prefiriéndose su uso frente a otros debido a su baja fitotoxicidad. También destaca por su uso contra la yesca de la vid, enfermedad fúngica que ataca los cultivos de uvas [294]. Es rápidamente absorbido mediante exposición oral, aunque se excreta fácilmente en la orina. Aunque no presenta signos de toxicidad a corto plazo, una exposición crónica a TBZ puede producir daños en el hígado y el páncreas [293,294].

Carbarilo (CB)

El CB (naftaen-1-il N-metilcarbamato) es un N-metilcarbamato ampliamente utilizado como insecticida y molusquicida.

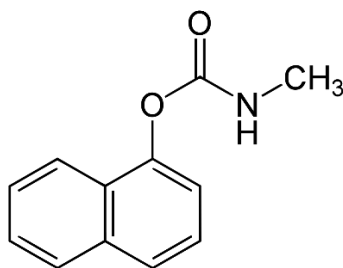


Figura 45. Estructura del CB

Se trata de un pesticida muy empleado en una gran variedad de frutas y verduras, cultivos de granos y cultivos de flores y ornamentales. Presenta una alta tasa de absorción vía oral y dérmica y, aunque se excreta a través de la orina, se ha observado acumulación de sus productos metabólicos en tejidos grasos como el hígado, los riñones y el cerebro, o unido a proteínas plasmáticas en la sangre [295]. Estos descubrimientos, unido a su alta toxicidad tanto en exposiciones cortas como repetidas, han ocasionado su prohibición en la Unión Europea, aunque continúa usándose en otros mercados como el estadounidense, el australiano o en países en vías de desarrollo. Ha sido relacionado con diversos tipos de cáncer, desórdenes metabólicos, problemas neurológicos crónicos o alteraciones en el sistema reproductivo masculino [295,296].

O-Fenilfenol (OPP)

El OPP (o-fenilfenol o 2-fenilfenol) es un ortofenilato que destaca como fungicida de amplio espectro.

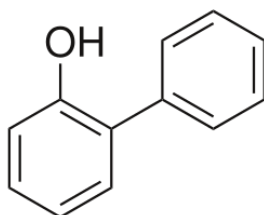


Figura 46. Estructura del OPP

Por sus propiedades fungicidas y desinfectantes, es uno de los fungicidas más empleados en el tratamiento postcosecha de diversas frutas, especialmente en cítricos. Concretamente, se emplea en asociación con ceras y/o resinas, frecuentemente mezclado con otros pesticidas como el tiabendazol, para proteger dichas frutas de la podredumbre originada por hongos durante el almacenamiento, retrasar su envejecimiento y evitar la pérdida de peso mediante la transpiración, a la vez que mejora su aspecto aumentando su brillo [297]. Aunque se cree que puede causar daños en el hígado de mamíferos, se considera de baja toxicidad asociado a su uso como fungicida postcosecha en frutas de cáscara no comestible [298,299].

Determinación de los pesticidas seleccionados

Los cuatro pesticidas seleccionados comparten una característica en común: su fluorescencia nativa. Por ello, una de las técnicas de detección más ampliamente utilizadas para su análisis es la espectrofluorimetría, la cual se ha utilizado para el análisis de CBZ [300–

302], TBZ [303–305] y CB [306,307] mediante fluorescencia en disolución. También es frecuente recurrir al uso de sensores fluorimétricos, los cuales han sido aplicados para el análisis de estos cuatro pesticidas en sensores mono y multiparámetro para la determinación de hasta tres pesticidas [246,260,308–311]. Otras técnicas comúnmente explotadas, especialmente para el análisis de carbamatos, son las técnicas electroanalíticas [201,257,312] o la espectroscopía Raman [313].

Sin embargo, para la determinación de todos ellos en un mismo análisis, al igual que para el resto de pesticidas, existe una clara tendencia a emplear métodos de análisis multiresiduo mediante el uso de técnicas cromatográficas, especialmente HPLC. Continuamente surgen nuevos trabajos en bibliografía que describen métodos capaces de determinar un amplio número de analitos en un mismo análisis mediante el uso de GC-MS [314–317] y HPLC con detección espectrofotométrica [318–320] o fluorimétrica [319,321], así como espectrometría de masas [322–324]. Con esta última técnica se han descrito métodos para todo tipo de matrices alimentarias, tanto de origen animal como vegetal [325].

3.5.3. Aditivos plásticos

En la sociedad actual, el empleo de materiales de envasado es imprescindible para proteger el alimento durante su almacenamiento, transporte y distribución, permitiendo así su conservación durante más tiempo y evitando su contaminación química y microbiológica hasta el

momento de su consumo. En este sentido los materiales plásticos juegan un papel fundamental, ya que su uso se ha disparado frente al de otros materiales debido a las ventajas que ofrece como son su bajo coste, su versatilidad, su resistencia mecánica y a la corrosión o sus propiedades higiénicas.

Sin embargo, estos materiales no son del todo inertes, sino que interactúan con el alimento, pudiendo producirse fenómenos de difusión que pueden producir la migración de sustancias desde el envase al alimento. Esto puede alterar las propiedades organolépticas del alimento o incluso producir una contaminación con sustancias potencialmente tóxicas [326]. Las sustancias que son susceptibles de migración son aditivos que se añaden a la formulación del plástico para modificar sus propiedades (plastificantes, lubricantes o antioxidantes, por ejemplo), así como monómeros residuales presentes debido a una polimerización incompleta, o productos de degradación generados durante la fabricación o transformación del material [327].

Debido a la potencial toxicidad de estos migrantes, se hace imprescindible el desarrollo de normativas y regulaciones que regulen el uso de monómeros y aditivos que se pueden emplear en la fabricación de estos materiales. En Europa, el Reglamento 10/2011 [328] y sus posteriores modificaciones establece una lista de sustancias permitidas en la fabricación de materiales plásticos destinados al contacto con alimentos, así como límites de migración específica (SML) para la mayoría de ellas, así como los ensayos de control obligatorios a los que deben estar sometidos estos materiales. Por otro lado, la EFSA es la encargada de evaluar los posibles riesgos para la salud de estas

sustancias, cuyos estudios son determinantes a la hora de establecer o modificar dichos SML.

Puesto que la migración depende de múltiples factores como el espesor del material, la concentración del migrante, la naturaleza del alimento o las condiciones de contacto, se hace necesaria la estandarización de las metodologías de análisis. Por ello, estos ensayos se realizan empleando simulantes alimentarios como sustitutos del alimento envasado, y se ponen en contacto con el material en unas determinadas condiciones de tiempo y temperatura. Los simulantes y las condiciones se seleccionan en base a los criterios establecidos en el reglamento 10/2011, estableciéndose el uso de disoluciones acuosas para la mayoría de los alimentos, y de un aceite con una determinada composición para alimentos grasos (como aceite de oliva rectificado). De este modo se garantiza la obtención de resultados comparables entre laboratorios.

4,4'-dihidroxibifenilo (DHBP)

El DHBP (4,4'-bifenol) es un monómero intermedio empleado en la fabricación de diversos plásticos.

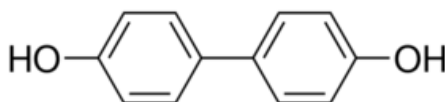


Figura 47. Estructura 4,4'-dihidroxibifenilo

El DHBP se emplea como monómero en la fabricación de termoplásticos como policarbonatos, polisulfonas y polímeros de cristal líquido, entre otros [329–331]. Además, se usa como aditivo

antioxidante en otros polímeros, debido a que actúa como inhibidor del envejecimiento [332]. Por ello, puede estar presente en materiales en contacto con alimentos como botellas y biberones de policarbonato, láminas de poliéster o poliolefinas, o en el recubrimiento de latas de conserva. Diversos estudios han reportado sus potenciales efectos adversos sobre la salud, como disruptor endocrino con actividad oestrogénica y antiandrógena [333,334].

Determinación de 4,4-dihidroxibifenilo

Una vez realizada la exposición del plástico a los simulantes, la determinación de los distintos migrantes suele realizarse mediante métodos cromatográficos [335]: los simulantes acuosos se analizan mediante inyección directa, mientras que el simulante graso ha de someterse a un proceso de tratamiento de muestra, generalmente LLE [336]. En concreto, el método oficial para el análisis de DHBP realiza la determinación del analito mediante HPLC con detección UV [337], aunque también se ha descrito el uso de GC-MS para su determinación [338].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. Resultados y discusión

Durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral se han llevado a cabo diversos estudios enfocados a la mejora de la automatización del tratamiento de muestra empleando para ello sistemas de análisis en flujo. En concreto, se han empleado tanto la técnica de SIA como de MSFIA con detección fluorimétrica. En este capítulo se exponen dichos estudios, estando todos ellos publicados en revistas internacionales recogidas en el *Journal Citation Report*.

Los trabajos recogidos en esta Memoria se pueden clasificar en dos grupos:

1. Mejora de los optosensores en flujo continuo con capacidad para la separación de diferentes analitos en un mismo análisis. Para ello se ha recurrido al uso de una cantidad adicional de soporte sólido en la célula de flujo, que actúa como una minicolumna de SPE eliminando el uso de accesorios adicionales. Se incluyen en este grupo los siguientes trabajos:
 - Separación de una mezcla binaria de pesticidas en frutas usando un optosensor en flujo continuo.
 - Novedosa separación y determinación secuencial de una mezcla cuaternaria de fungicidas usando un optosensor fluorimétrico automatizado.
2. Mejora de la LLE automatizada. Se aplicó tanto a muestras acuosas como a muestras oleosas. Los trabajos incluidos en este grupo son

los siguiente:

- Un nuevo enfoque para la extracción líquido-líquido automatizada en un sistema de inyección secuencial.
- Extracción líquido-liquido automatizada en un sistema de análisis en flujo multijeringa para estudios de migración en materiales de contacto alimentario: análisis de 4,4'-dihidroxibifenilo.

4.1. Separación de una mezcla binaria de pesticidas en frutas usando un optosensor en flujo continuo.



E. J. Llorent- Martínez, I. Delgado-Blanca, A. Ruiz-Medina P. Ortega-Barrales.

Publicado en *Talanta* en Junio de 2013, volumen 115, páginas 462-467.

Resumen

Se desarrolló un optosensor biparamétrico con detección fluorimétrica para la determinación de mezclas de dos pesticidas ampliamente utilizados en frutas: carbendazima y o-fenilfenol. Se empleó gel de sílice enlazada con C₁₈ como soporte sólido. La separación de los pesticidas se consigue gracias al uso de una cantidad adicional de soporte sólido en la célula de flujo, aprovechando las diferencias en la cinética de retención/desorción de los analitos sobre la superficie de las micropartículas de C₁₈. La automatización se llevó a cabo empleando un sistema SIA, gracias al cual se minimiza la generación de residuos.

De este modo, tanto la separación como la determinación se integran en la propia célula de flujo, simplificando sustancialmente el sistema. Después de la separación de los analitos, se mide su fluorescencia nativa, obteniendo una respuesta lineal en el rango de 2.0-30 y 1.1-120 mg kg⁻¹ para carbendazima y o-fenilfenol, respectivamente. Su límite de detección es de 0.60 mg kg⁻¹ y de 0.33 mg kg⁻¹ para cada uno de ellos. El método propuesto es adecuado para la determinación de estos pesticidas en frutas acorde a los límites máximos (MRLs) permitidos en Europa y Estados Unidos, 5-10 mg kg⁻¹. Para demostrar la aplicabilidad del sistema desarrollado, se analizaron muestras variadas de frutas (cereza, piña y mango), y se realizaron estudios de recuperación en las mismas. Los resultados obtenidos fueron comparados con un método cromatográfico para validar el método.

El método propuesto demostró la utilidad de los optosensores en flujo continuo para aplicaciones específicas, como el análisis de un pequeño número de analitos en muestras complejas. El uso del soporte sólido en la zona de detección proporciona una mejora en la sensibilidad y selectividad, en comparación al análisis en disolución, lo que permite obtener los límites de detección requeridos por la legislación pertinente. Como resultado, el método desarrollado constituye una alternativa a los métodos cromatográficos en aplicaciones específicas que no requieren la determinación de más de dos analitos, disminuyendo significativamente aspectos como los costes y tiempos de análisis o la generación de residuos.

“Separation of a binary mixture of pesticides in fruits using a flow-through optosensor”

Abstract

A flow-through optosensor is here proposed for the determination of mixtures of two widely used pesticides, carbendazim and o-phenylphenol, in fruits. The pesticides are separated on-line using an additional amount of solid support, C₁₈ silica gel, in the flow-through cell. The resolution is performed due to the different retention/desorption kinetics of the analytes when interacting with the C₁₈ microbeads. Therefore, both separation and determination are integrated in the same cell, considerably simplifying the system. In addition, the use of Sequential Injection Analysis provides a high degree of automation and minimum wastes generation. After the analytes are separated, their native fluorescence is measured, obtaining linearity in the 2.0–30 and 1.1–20 mg kg⁻¹ ranges for carbendazim and o-phenylphenol. The detection limits are 0.60 and 0.33 mg kg⁻¹ for carbendazim and o-phenylphenol respectively. The proposed method fulfills the maximum residue limits (MRLs) established in Europe and USA for these pesticides in cherries, pineapple, and mango: 5–10 mg kg⁻¹. In order to demonstrate the suitability of the method, several samples have been analyzed and the obtained results compared with a chromatographic method.

Keywords

SIA, Automation, Plagicide, MRL, On-line separation

1. Introduction

In the last years, the detection of environmental hazardous chemicals has been rising in demand. Pesticides (herbicides, fungicides or insecticides) are substances intended for preventing, destroying, repelling or mitigating any pest. Their worldwide use can lead to their accumulation in soil, water, atmosphere, and agricultural products, and they can therefore exist in harmful levels, posing an environmental threat. Over 98% of sprayed insecticides and 95% of herbicides reach a destination other than their target species [1]. As a result, the development of new analytical methods for the determination of these compounds in a wide variety of samples is today a high-interest research area.

Carbendazim (CBZ) and o-phenylphenol (OPP) are two widely used fungicides, mainly used for the post-harvest treatment of fruits and vegetables. Hence many analytical methodologies have been described for their reliable determination in a wide range of matrices. Modern analytical methods for their quantitation usually involve liquid chromatography [2–8] or gas chromatography [9–11] coupled to mass spectrometry detection. These methodologies present unique outstanding properties for multi-residue analysis in complex matrices, due to their high sensitivity and selectivity. In recent years, [12,13] electrochemical [14,15] methods have also been utilized for the analysis of CBZ. Compared to chromatography, these methods focus in only a

small number of analytes and specific applications. Among them, the design of flow-based analytical methods is a field of special interest due to their intrinsic favorable characteristics, especially their low-cost and low wastes generation [16,17]. In order to improve other features of flow methods, such as sensitivity and selectivity, a possible modification is the implementation of Solid- Phase Spectroscopy (SPS) in flow analysis, which is called flow-through optosensing. In these systems, the target compound is retained on an appropriate solid support placed in the flow- through cell, and its detection is performed directly on these microbeads, therefore improving the selectivity and sensitivity [16,18,19].

A high percentage of the flow optosensors described in scientific literature have focused in the analysis of pharmaceuticals and water samples [20–22], although that tendency has changed in the last few years, observing applications in the alimentary field for both contaminants and natural compounds [23–25]. Although multi-parametric sensors have been previously described [26–29], they have been mainly applied to the determination of the target compounds in clinical or water samples, and very rarely in food products [24].

In this manuscript we present a biparameter flow-through optosensor for the determination of two widely used pesticides, carbendazim (CBZ) and o-phenylphenol (OPP), in fruits. The most common strategy for the on-line separation of the analytes in the flow-system consists in using a mini-column filled with the same solid support used in the flow-through cell and placed just before the cell [24,26,28,30]. In addition, a less used approach consists in using an

extra amount of solid support in the flow-cell [27,31]. In both cases, the separation of the analytes is achieved due to their differences in the sorption/elution process on the solid support microbeads. However, performing the separation directly in the flow-cell clearly simplifies the flow manifold and has been the selected strategy in this work. This is the first time that a biparameter flow-through optosensor, separating the analytes without using a pre-column, is described with applications in the alimentary field.

Sequential Injection Analysis (SIA) has been chosen as the flow methodology, increasing the automation and robustness of the developed method. Using QuEChERS [32] as the extraction procedure, CBZ and OPP can be fluorimetrically detected after their on-line separation. The proposed method fulfills the maximum residue limits (MRLs) established in Europe and USA for these pesticides in cherries, pineapple and mango: 5–10 mg kg⁻¹ [33,34]. In addition no matrix-effect has been observed, therefore avoiding the use of matrix-matched standards for the proposed applications.

2. Experimental

2.1 Reagents and solutions

CBZ and OPP (Sigma, Alcobendas, Madrid, Spain) stock solutions of 100 µg mL⁻¹ were prepared by weighing the appropriate amount of analyte and dissolving in methanol (MeOH). The solutions remained stable for at least 1 month when kept away from light at about 4 °C.

These stock solutions were used to prepare the working standard solutions by suitable dilution with deionized water.

MeOH, sodium chloride and anhydrous magnesium sulfate were obtained from Panreac (Barcelona, Spain); all of them were reagent grade. Ammonia and acetonitrile (HPLC grade) were obtained from Sigma. Primary-secondary amine (PSA) (Supelclean PSA SPE bulk packing) was obtained from Supelco (Bellefonte, PA, USA). C₁₈ bonded phase silica gel beads (Waters, Milford, USA) with 55–105 µm of average particle size, were used as solid support. All the pesticides used in the interference study were obtained from Sigma.

2.2 Apparatus and instruments

A FIALab-3500 automatic analyzer (FIALab Instruments, Inc., the USA) was used to construct the manifold (Fig. 1). The analyzer includes two 5-mL syringe pumps, a holding coil, a peristaltic pump and an 8-port multiposition valve, being all the components computer-controlled by FIALab 5.0 software. The analyzer was connected to a Cary-Eclipse Luminescence Spectrometer (Varian Inc., Mulgrave, Australia) for luminescence measurements. A Hellma flow cell 176.052-QS (25 µL inner volume and 1.5 mm light path length) was used. The cell was filled with C₁₈ solid support microbeads, as slurry suspension in methanol, with the aid of the peristaltic pump. The outlet of the cell was blocked with glass wool, avoiding the movement of the solid support but allowing the flow of solutions. An additional amount of solid support was used in the cell as a strategy to separate the analytes, just above

the detection area. The manifold is shown in Fig. 1, representing only the components of the FiaLab that have been used in the method, for simplicity's sake.

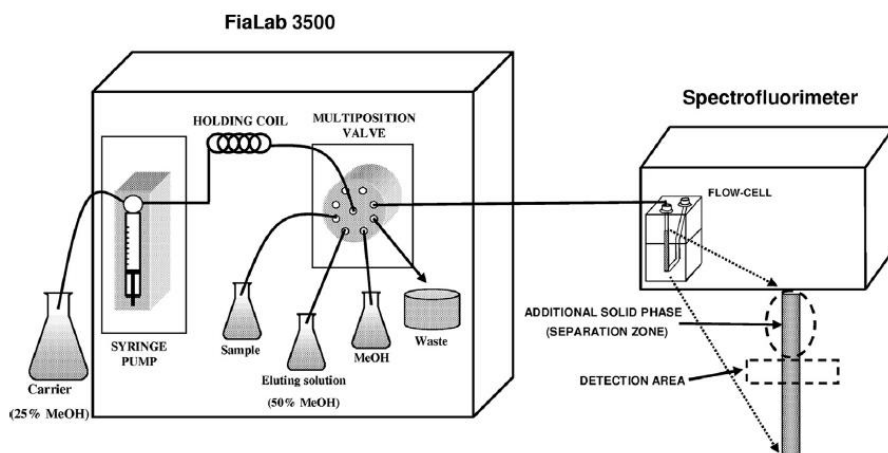


Fig. 1. SIA manifold.

A T18-basic Ultra-Turrax from IKA (Spain) was used for the homogenization of the analyzed samples.

An HPLC method was selected as reference method. CBZ and OPP separation was carried out using an HPLC system (Agilent Series 1100, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), consisting of vacuum degasser, autosampler, and a binary pump. A reversed phase C₁₈ analytical column of 50 x 2.1 mm² and 2.6 mm particle size (Kinetex, Phenomenex) was used for the separation, at ambient temperature. Mobile phases A and B were water with 0.1% formic acid (v/v) and acetonitrile, respectively. A linear gradient from 10% B to 70% B in 15 min was used, with a flowrate of 0.35 mL min⁻¹. The HPLC system was connected to an ion trap mass spectrometer (Esquire 6000, Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA) equipped with an electrospray interface.

CBZ was determined in positive-ion mode, $[M+H]^+$ at m/z 192 with a fragment at m/z 160. OPP was determined in negative-ion mode, $[M-H]^-$ at m/z 169.

2.3 Sample treatment

The QuEChERS method [32] was selected for the extraction of CBZ and OPP from the selected samples (cherries, pineapple and mango), being all of them obtained from local markets.

An Ultra-Turrax was used for sample homogenization. Pineapples were peeled before being ground, stones were removed from mangos before grinding them, and cherries were directly ground.

For the extraction procedure, 15 g of previously homogenized sample were weighed in a 50 mL PTFE centrifuge tube and 15 mL acetonitrile were added. The screw cap was closed and the tube was vigorously shaken for 1 min by hand ensuring that the solvent interacted well with the entire sample. Then, 2.5 g of sodium chloride and 6 g of anhydrous $MgSO_4$ were added, repeating the shaking process for 1 min to prevent coagulation of $MgSO_4$. Then, the tube was centrifuged at 3700 rpm for 3 min. 5 mL of the supernatant (acetonitrile phase) were taken with a pipette and transferred to a 15 mL centrifuge tube. After adding 750 mg anhydrous $MgSO_4$ and 250 mg PSA sorbent, the tube was vigorously shaken for 30 s by hand and centrifuged again for 3 min. The obtained supernatant was further diluted 80-fold with deionized water prior to analysis by the proposed method.

2.4 General procedure

The flow rate of the syringe pump was set at 100 mL s⁻¹ for aspiration and 22 mL s⁻¹ for propulsion. The lower flow-rate for the propulsion of solutions was caused by the potential overpressures due to the solid support placed in the flow-cell; high flow-rates could produce leaking of solutions between connections.

Before starting the recording of the analytical signal, the solid support was conditioned with 4 mL of carrier solution (25% MeOH: H₂O, v-v). All experiments were carried out by triplicate and the analytical signal was expressed as mean values of peak height.

Once the solid support was conditioned, the procedure used for the analysis of each sample was as follows:

- (a) 500 µL of carrier solution and 200 µL of sample solution were aspirated and pumped toward the waste in order to avoid contamination with the previous sample.
- (b) 2000 µL of carrier solution and 800 µL of sample solution were aspirated again and pumped toward the flow-cell. The on-line separation of the analytes took place on the solid support placed inside the flow-cell (Fig. 1). OPP was strongly retained on the top part of the solid support (non-irradiated area), whereas CBZ passed through the flow-cell (due to its faster retention/desorption kinetic process), developing its analytical signal ($\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 276/306$ nm/nm) in the detection area (irradiated zone). CBZ was completely eluted from the solid phase by the carrier itself, whereas OPP remained

retained in the upper part of the cell.

(c) After CBZ had developed its analytical signal, 1500 μL of eluting solution (50% MeOH:H₂O, v-v) were introduced in the system in order to elute OPP from the upper part of the solid support, recording its analytical signal ($\lambda_{\text{exc}}/\lambda_{\text{em}}=250/345$ nm/nm) in the detection area. 500 μL of carrier solution was also inserted in the system in order to prepare the solid support for the next sample solution.

3. Results and discusión

3.1 Spectral characteristics and instrumental parameters

The most common solid supports used in flow-through optosensing are the ion-exchangers Sephadex, the non-ionic C₁₈ silica gel and the polymeric supports Amberlite XAD. Previous studies carried out in our research group showed favorable retention of CBZ and OPP in C₁₈ silica gel, so it was the selected one to carry out the separation and detection of the pesticides.

The spectral characteristics of CBZ and OPP were recorded with each individual analyte retained on the C₁₈ solid support placed in the flow-cell. Fluorescence spectra showed maxima excitation/emission wavelengths at 276/306 and 250/345 nm/nm for CBZ and OPP, respectively, therefore selecting these wavelengths for further experiments.

Fluorescence measurements recorded in solid phase are affected by background signals higher than the ones found in homogeneous solutions. This effect is obviously due to the presence of the solid microbeads in the flow-cell. Therefore, instrumental parameters must be carefully studied in order to achieve the best possible signal-to-background ratio. For this reason, the voltage of the photomultiplier tube (400–1000 V) and the instrument excitation and emission slit widths (5– 20 nm) had to be optimized. Taking into account that the MRLs established for CBZ and OPP are similar, but that CBZ presents lower sensitivity, the instrumental parameters were adjusted in order to improve the analytical response from CBZ. As a result, the photomultiplier tube voltage was set at 620 V and the excitation and emission slit widths were fixed at 5 and 10 nm, respectively.

3.2 Separation of CBZ and OPP and chemical variables

The resolution of CBZ and OPP was performed by a temporary sequentiation in the arrival of the analytes to the detection area. This was achieved due to the different sorption/elution kinetic process of the analytes on the solid support placed in the flow-cell (separation zone in Fig. 1). Therefore, the amount of solid support packed in the flow-cell had to be carefully examined in order to achieve the complete separation of the analytes. The flow-cell was filled with different amounts of C₁₈ beads (40–70 mg), as slurry suspension in methanol, using the peristaltic pump. In all cases, the entire light-path of the cell was filled, covering the detection zone, and the required amount of

solid support in the separation zone was studied. This study showed that low amounts of C₁₈ beads could not prevent OPP from performing its analytical signal before CBZ was completely eluted (Fig. 2a and b). However, when the separation zone was filled with solid support microbeads (Fig. 2c), the separation was complete. Finally, 65 mg of C₁₈ beads (26 mm height above the irradiated area) were required to resolve the mixture CBZ/OPP. The filling process became highly reproducible when the exact amount of solid support was weighed to fill the flow-cell (RSDs lower than 10%). More than 80–90 samples could be analyzed without replacing the solid support.

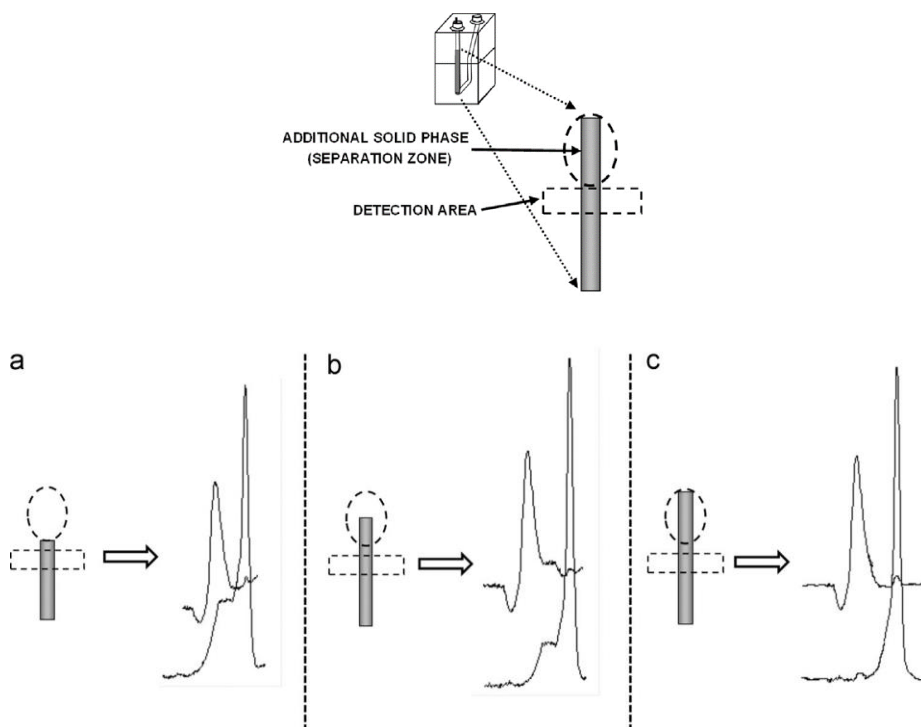


Fig. 2. Optimization of the amount of solid support in the flow-cell: (a) no separation area; (b) $\frac{1}{2}$ separation area; and (c) full separation area.

Then, the nature of carrier and eluting solutions was also optimized

for both CBZ and OPP. Taking into account the non-polar nature of C₁₈ silica gel beads, solutions containing MeOH and water in different proportions are usually used as carrier and eluting solutions. In the first place, we tested different solutions as carrier in the 10–40% range (MeOH:H₂O, v-v). The selected percentage of MeOH had to be high enough to elute CBZ from the solid support, but not too high, so OPP could remain retained on the separation zone. A 25% MeOH:H₂O solution was selected as the optimum carrier solution. Once the carrier had been fixed, the eluting solution for OPP was studied in the 30–70% range (MeOH: H₂O, v-v). In this case, it was observed that OPP could not be eluted with percentages of MeOH lower than 50%, and that the analytical signal decreased for higher percentages due to a lower retention of OPP on the solid support. Therefore, 50% MeOH was selected for further experiments.

Finally, although the solid support could be completely regenerated by the eluting solution when CBZ and OPP standards were analyzed, the baseline slightly increased after each insertion of real samples due to the complex matrix; this increase is due to the compactation of the solid support beads. In Fig. 3, it can be observed this increase in the baseline after each sample determination. Although the analytical signal remained constant (both baseline and peak height increased at the same time), 600 µL of MeOH was inserted after several sample insertions in order to recover the baseline and eliminate the high compactation of the solid microbeads. This effect can be observed in Fig. 3. In this same figure, the absence of baseline increase when standard solutions are injected can also be appreciated.

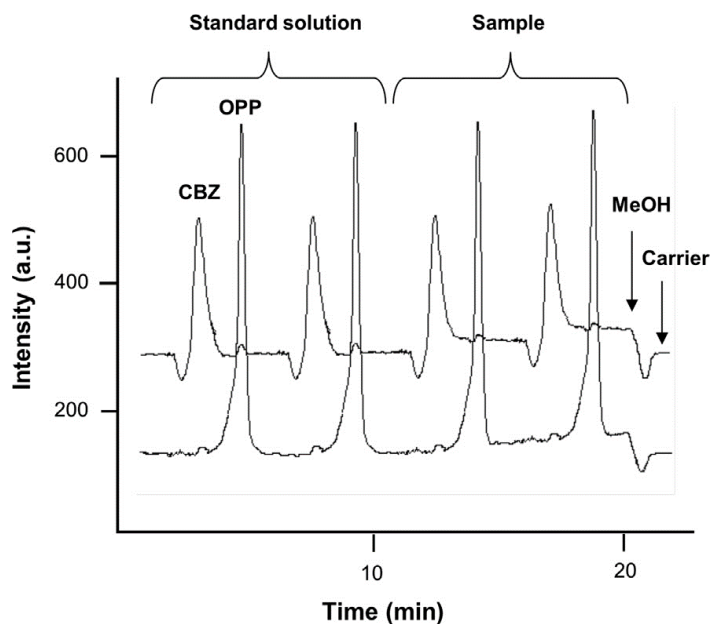


Fig. 3. SIA profile from a standard solutions and from a pineapple sample, both with 8 and 10 mg kg⁻¹ of CBZ and OPP, respectively. It can be observed an increase in the baseline after the insertion of sample solution due to the solid support compaction, and its complete recovery after MeOH insertion.

3.3 SIA variables

First of all, the sample volume was optimized. In flow-through optosensors, if the volume of sample inserted in the system increases, the amount of analyte retained on the beads also increases. Therefore, the analytical response and the sensitivity are also higher. However, the insertion of high volumes of sample also produces a decrease in sample throughput. As a result, a compromise between sensitivity and sampling frequency is usually adopted. In the proposed method, the sample volume was studied from 100 up to 1500 μL , using standard solutions corresponding to 10 and 8 mg kg⁻¹ of CBZ and OPP,

respectively. It was observed that the analytical signal increased linearly up to 1000 mL of sample solution for CBZ and OPP. The regression equations for the effect of the sample volume on the analytical signal were $I = 1.9 + 293.5 V$ ($r = 0.997$; V in mL) and $I = -5.4 + 416.6 V$ ($r = 0.998$; V in mL) for CBZ and OPP, respectively. However, a sample volume of only 800 mL was selected, because the sensitivity was good enough for the analysis of real samples, obtaining a high sample throughput. 2000 and 1500 mL of carrier and eluting solutions were required for the elution of CBZ and OPP, respectively. The corresponding graph for this study is shown in Fig. 4.

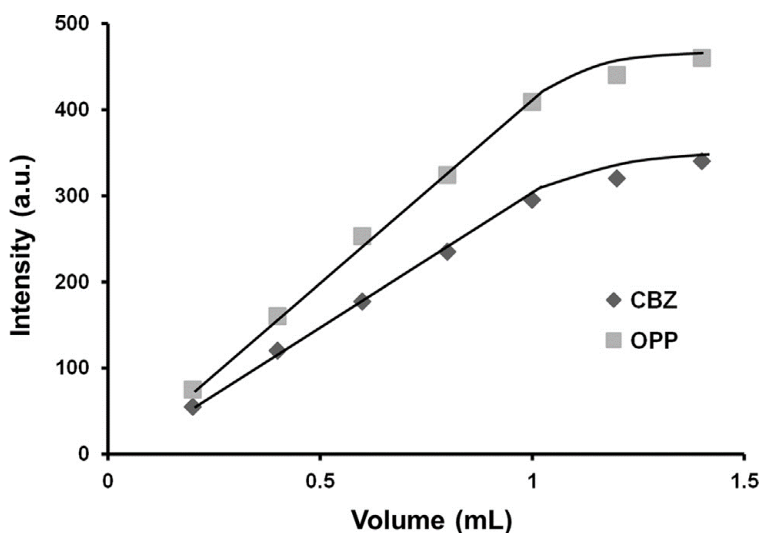


Fig. 4. Effect of the sample volume on the analytical signal; 10 and 8 mg kg⁻¹ of CBZ and OPP, respectively.

After the volumes of solutions were optimized, the effect of the flow-rate was also studied. For the aspiration of solutions, a flow-rate of 100 mL s⁻¹ was selected in all cases, in order to shorten the time of analysis. For the process of delivering solutions toward the flow-through

cell, the flow-rate was investigated from 15 to 28 mL s⁻¹. By increasing it, the sampling frequency increased but over-pressure could appear in the system (leading to leaking of solutions in tubing connections). Finally, 22 mL s⁻¹, the highest possible flow-rate without over-pressure problems, was selected.

3.4 Analytical parameters

The analytical parameters of the system were studied using the optimized conditions previously discussed. Table 1 contains the figures of merit of the proposed method using a sample volume of 800 µL. The calibration graph was constructed using 7 standard solutions, and the data were fitted by standard least-squares treatment. The proposed methodology was able to produce analytical fits with good linearity in the range 2.0–30 and 1.1–20 mg kg⁻¹ for CBZ and OPP, respectively. The detection limits were 0.60 and 0.33 mg kg⁻¹ for CBZ and OPP, respectively.

Table 1: Analytical parameters.

Parameter	CBZ	OPP
Linear Dynamic range (mg kg ⁻¹)	2-30	1.1-20
Calibration graph		
Intercept	5.7125	2.5286
Slope (kg mg ⁻¹)	24.0432	41.3788
Correlation coefficient	0.9992	0.9994
Detection limit (mg kg ⁻¹)	0.6	0.33
Cuantification limit (mg kg ⁻¹)	2	1.1
Sample throughput (h ⁻¹)	12	

Inter- and intra-day repeatabilities were established for 10 independent analyses of CBZ/OPP solutions at three different levels: 5 and 4; 10 and 8; and 22 and 16 mg kg⁻¹ for CBZ and OPP, respectively. On one hand, the intra-day repeatabilities were in the 3.0 – 4.2% and 2.3–3.3% ranges for CBZ and OPP, respectively. On the other hand, the inter-day values (%) were in the 6.1–6.8 and 5.7–6.2 ranges for CBZ and OPP, respectively. A sample throughput of 12 samples per hour was obtained.

3.5 Ruggedness and robustness

The ruggedness of the method was assessed by comparison of the intra- and inter-day assay results undertaken by two analysts. The RSD values (%) for intra- and inter-day assays did not exceed 5% and 8%, respectively, indicating the ruggedness of the method.

The robustness of the method, which can be described as its capacity to remain unchanged when there are small variations in experimental conditions, was also studied. In this case, small changes were carried out in the carrier solution (22–28% MeOH: H₂O, v-v), eluting solution (47–53%), flow-rate (20–24 mL s⁻¹) and fluorescence wavelengths (± 2 nm in both excitation and emission). Fluctuations lower than $\pm 5\%$ were observed when compared to the optimum parameters, so demonstrating the robustness of the proposed method.

3.6 Selectivity study

In order to check the usefulness of the proposed method for the analysis of real samples, the potential interference from other pesticides was studied in this section. For this study, extracts from real samples (checked by the HPLC–MS method in order to confirm the absence of the analytes) were used, spiking the extracts after the extraction procedure. Then, different pesticides (fluorescent and non-fluorescent) that are widely used were added to extract solutions containing CBZ and OPP, and their influence on the analytical signal was investigated. Tolerance level was defined as the amount of foreign species that produced an error not exceeding $\pm 2s$ in the determination of the analyte, being s the standard deviation. The obtained results are summarized in Table 2. It can be observed that both analytes could be analyzed, without significant errors, in the presence of high levels of potentially interfering compounds that could be present in real samples.

The potential interference from CBZ on OPP and viceversa when an excess of one of them is present was also evaluated. Under the optimized conditions, CBZ tolerated a 5-fold level of OPP, whereas OPP tolerated a 9-fold concentration of CBZ.

Table 2: Interference study.

Foreoreign species	Tolerated interferent/analyte (w/w) ratio	
	CBZ ^a	OPP ^b
Imazalil, simazine, morestan ^c , chlorsulfuron	> 1000	> 100
Bendiocarb ^c , aminocarb ^c	> 1000	80
Propoxur, quinmerac ^c , imazaquin	200	> 100
Carbaryl ^c	> 100	9
Carbofuran ^c	100	50
Carbendazim ^c	-	9
o-phenylphenol ^c	5	-

^aFor a 8 mg kg⁻¹ CBZ concentration.

^bFor a 5 mg kg⁻¹ OPP concentration.

^cFluorophore.

3.7 Applications

The proposed system was applied to the determination of CBZ and OPP in cherries, pineapples and mangos. All samples (6 cherries, 5 pineapples and 5 mangos) were obtained from local markets.

In all cases, CBZ and OPP levels were below the detection limit of the proposed method. In addition to the proposed method, we also used a reference HPLC–MS method for the analysis of the samples. No presence of CBZ or OPP was detected with the HPLC method either. As a result, we decided to perform recovery studies to evaluate the accuracy of the method. Two samples from each fruit were selected for

the recovery study. These experiments were accomplished by spiking the samples at different concentration levels (3–22 mg kg⁻¹), which are close to the legislated values [33,34]. In all cases, the sample (previously homogenized as described in Section 2.3.) was spiked with the required volumes of the 100 mg mL⁻¹ CBZ and OPP stock solutions, the mixture was gently blended to assess the homogeneity of the sample and it was allowed to stand at room temperature for 12 h in order to evaporate the solvent (MeOH). After that, it was kept in the fridge until the extraction method and analysis were performed.

The experimental results obtained by the proposed method were compared with those ones obtained by the HPLC reference method by means of a t-test and a F-criterion at a 5% significance level. In all cases, the average results obtained by both methods were statistically identical, as the difference between the averages had no significance at the probability level indicated. All results are shown in Table 3.

Table 3: Applications

	CBZ					OPP				
	Added	Found (mg kg ⁻¹) ^a	Found (mg kg ⁻¹) ^a	t _{cal} ^c	F _{cal} ^c	Added	Found (mg kg ⁻¹) ^a	Found (mg kg ⁻¹) ^a	t _{cal} ^c	F _{cal} ^c
	(mg kg ⁻¹)	Proposed method	Reference method			(mg kg ⁻¹)	Proposed method	Reference method		
Cherry-1	4	4.2±0.2	4.0±0.2	1.4	1.0	5	5.0±0.1	4.8±0.2	2.0	0.3
	15	14±0.6	14.7±0.4	1.7	1.8	8	8.2±0.4	8.3±0.3	0.2	1.4
Cherry-2	5	4.6±0.2	4.8±0.1	1.2	1.0	4	3.8±0.2	4.1±0.2	2.3	1.0
	10	10.2±0.4	10.4±0.4	0.6	0.9	10	9.3±0.4	9.5±0.5	0.6	0.7
Mango-1	5	5.0±0.2	5.1±0.2	0.6	1.0	5	5.4±0.2	5.1±0.2	1.6	1.5
	15	14.4±0.6	14.8±0.4	0.9	1.8	12	11.0±0.4	11.3±0.4	0.8	0.6
Mango-2	4	4.1±0.1	4.3±0.2	1.0	0.3	3	2.6±0.1	2.7±0.1	0.8	2.2
	22	23.3±0.5	22.8±0.9	0.9	0.3	10	11.5±0.2	11.0±0.6	1.3	0.5
Pineapple-1	3	2.8±0.2	2.7±0.1	0.8	1.2	4	4.2±0.2	4.2±0.1	0.0	2.5
	12	11.2±0.5	11.9±0.5	1.9	1.0	10	9.5±0.5	9.1±0.4	1.1	1.9
Pineapple-2	15	14.9±0.6	15.3±0.8	0.8	0.6	7	6.9±0.4	7.2±0.3	1.0	1.5
	20	19.9±0.9	20.2±0.7	0.5	1.6	16	17.3±0.6	11.1±0.7	0.3	1.4

^aMeans of three determinations ±SD; ^bTheoretical value t=2.776, p=0.05; ^cTheoretical value F=19; p=0.05.

Thanks to the high dilution (80-fold) and the use of the solid support, no matrix effect was found and matrix-matched calibrations were not required. The absence of matrix effect can be observed in Fig. 3, in which similar signals are obtained for sample and standard solutions with the same levels of CBZ and OPP.

The obtained results showed the suitability of the proposed method for the determination of CBZ and OPP in fruits using the QuEChERS extraction procedure.

4. Conclusions

In this work, a flow-through optosensor was described for the determination of a binary mixture of pesticides in fruits. The on-line separation of CBZ and OPP was performed using an additional amount of solid support in the flow-through cell, which is a strategy scarcely described in scientific literature. The use of the solid support provided additional selectivity and sensitivity then compared to homogenous solution. As a result, no matrix effect was found, allowing the use of solvent calibration instead of matrix-matched standards. The obtained detection limits also allowed fulfilling the MRLs established by USA and Europe in cherries, pineapples and mangos. As a result, flow optosensing revealed itself as useful for the analysis of complex samples for specific applications, such as the analysis of a small number of target compounds in food.

Acknowledgments

The authors are grateful to the University of Jaén, Project UJA 2011/12/31, for financial support, and to Centro de Instrumentación Científico-Técnica (CICIT) for the availability of the HPLC system.

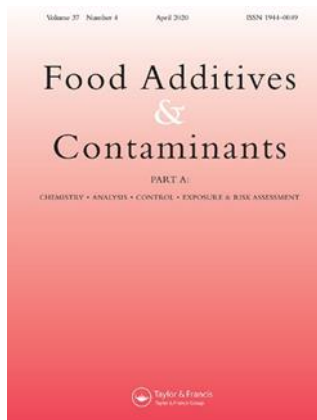
References

- [1] G.T. Miller, *Sustaining the Earth*, Thompson Learning, Inc. Pacific Grove, California, 2004, pp. 211-216.
- [2] R. Romero-González, A.G. Frenich, J.L.M. Vidal, *Talanta* 76 (2008) 211–225.
- [3] C. Ferrer, M.J. Martínez-Bueno, A. Lozano, A.R. Fernández-Alba, *Talanta* 83 (2011) 1552–1561.
- [4] K. Banerjee, D.P. Oulkar, S.B. Patil, M.R. Jadhav, S. Dasgupta, S.H. Patil, S. Bal, P. G. Adsule, *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 4068–4078.
- [5] A. Lazartigues, C. Fratta, R. Baudot, L. Wiest, C. Feidt, M. Thomas, C. Cren-Olivé, *Talanta* 85 (2011) 1500–1507.
- [6] G.C. Bedendo, I.C.S.F. Jardim, E. Carasek, *Talanta* 88 (2012) 573–580.
- [7] N. Yoshioka, Y. Akiyama, T. Matsuoka, T. Mitsuhashi, *Food Control* 21 (2010) 212–216.
- [8] X. Ye, L.J. Tao, L.L. Needham, A.M. Calafat, *Talanta* 76 (2008) 865–871.
- [9] J. Yang, D. Li, C. Sun, *Anal. Methods* 4 (2012) 3436–3442.
- [10] K. Takahashi, M. Horie, Y. Hirose, *J. Food Hyg. Soc. Jpn.* 49 (2008)

- 403–406.
- [11] P.Q. Tranchida, F.A. Franchina, M. Zoccali, S. Pantò, D. Sciarrone, P. Dugo, L. Mondello, *J. Chromatogr. A* 1278 (2013) 153–159.
- [12] M. del Pozo, L. Hernández, C. Quintana, *Talanta* 81 (2010) 1542–1546.
- [13] A. Waseem, M. Yaqoob, A. Nabi, *Anal. Lett.* 43 (2010) 603–617.
- [14] A.M. Ashrafi, J. Dordević, V. Guzsavány, I. Švancara, T. Trtić-Petrović, M. Purenović, K. Vytřas, *Int. J. Electrochem. Sci.* 7 (2012) 9717–9731.
- [15] P.L.A. Sundari, S.P. Palaniappan, P. Manisankar, *Anal. Lett.* 43 (2010) 1457–1470.
- [16] E.J. Llorent-Martínez, P. Ortega-Barrales, M.L. Fernández-de Córdoba, A. Ruiz-Medina, *Anal. Chim. Acta* 684 (2011) 21–30.
- [17] V.L.R.G. Abreu, J.L.M. Santos, J.L.F.C. Lima, *Food Anal. Methods* 5 (2012) 867–873.
- [18] S.M. Oliveira, H.M. Oliveira, M.A. Segundo, A.O.S.S. Rangel, J.L.F.C. Lima, V. Cerdá, *Anal. Methods* 4 (2012) 1229–1236.
- [19] S. Matsuoka, K. Yoshimura, *Anal. Chim. Acta* 664 (2010) 1–18.
- [20] L.M. Shen, M.L. Chen, X.W. Chen, *Talanta* 85 (2011) 1285–1290.
- [21] A. Valero-Navarro, A. Salinas-Castillo, J.F. Fernández-Sánchez, A. Segura-Carretero, R. Mallavia, A. Fernández-Gutiérrez, *Biosens. Bioelectron.* 24 (2009) 2305–2311.
- [22] G.N. Piccirilli, G.M. Escandar, F.C. Cañada, I.D. Merás, A. Muñoz de la Peña, *Talanta* 77 (2008) 852–857.
- [23] E.J. Llorent-Martínez, M.L. Fernández-de Córdoba, A. Ruiz-Medina, P. Ortega-Barrales, *Talanta* 96 (2012) 190–194.
- [24] L. Molina-García, A. Ruiz-Medina, M.L. Fernández-de Córdoba,

- Anal. Chim. Acta 689 (2011) 226–233.
- [25] L. Molina-García, M.L. Fernández-de Córdova, A. Ruiz-Medina, Talanta 96 (2012) 195–201.
- [26] E.J. Llorent-Martínez, P. Ortega-Barrales, A. Molina-Díaz, Anal. Bioanal. Chem. 383 (2005) 797–803.
- [27] E.J. Llorent-Martínez, P. Ortega-Barrales, A. Molina-Díaz, Spectrosc. Lett. 39 (2006) 619–629.
- [28] P. Ortega-Barrales, A. Domínguez-Vidal, M.L. Fernández-de Córdova, A. Molina Díaz, J. Pharm. Biomed. Anal. 25 (2001) 619–630.
- [29] G.N. Piccirilli, G.M. Escandar, Analyst 135 (2010) 1299–1308.
- [30] J.F. García-Reyes, E.J. Llorent-Martínez, P. Ortega-Barrales, A. Molina-Díaz, Talanta 64 (2004) 742–749.
- [31] E.J. Llorent-Martínez, J.F. García-Reyes, P. Ortega-Barrales, A. Molina-Díaz, Anal. Chim. Acta 555 (2006) 128–133.
- [32] M. Anastassiades, S.J. Lehotay, D. Stajnbaher, F.J. Schenck, J. AOAC Int. 86 (2003) 412–431.
- [33] (www.mrlidatabase.com/), January 2013.
- [34] FAO, WHO, (www.codexalimentarius.org/standards/pesticide-mrls/en), January 2013.

4.2. Novedosa separación y determinación secuencial de una mezcla cuaternaria de fungicidas usando un optosensor fluorimétrico automatizado



I. Delgado-Blanca, A. Ruiz-Medina P. Ortega-Barrales.

Publicado en *Food Additives and Contaminants: Part A* en Enero de 2019, volumen 36:2, páginas 278-288.

Resumen

En este trabajo se propone un optosensor en flujo multiparamétrico para la separación y determinación de cuatro pesticidas ampliamente utilizados en frutas: carbendazima, tiabendazol, carbarilo y o-fenilfenol. El método desarrollado se basa en el uso de un sistema SIA como medio de propulsión del flujo y un espectrofluorímetro como detector, en cuya célula de flujo se produce la preconcentración y separación de los analitos, seguida de la medida secuencial de su fluorescencia nativa. La separación de los pesticidas tiene lugar en un soporte sólido situado en el interior de la célula de flujo, donde los analitos son temporalmente inmovilizados y separados

de la matriz debido a sus diferentes cinéticas de retención/desorción cuando interaccionan con las micropartículas de sílice enlazada con C₁₈.

Se obtuvieron parámetros analíticos adecuados para los cuatro analitos seleccionados, con límites de detección y cuantificación comprendidos entre los rangos 0.1-0.5 y 0.2-1.6 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente. Estos valores cumplen con los requerimientos establecidos en el Codex Alimentarius para estos pesticidas. Además, el método es adecuado para la determinación de carbendazima, tiabendazol y o-fenilfenol acorde a los límites máximos (MRLs) permitidos en la Unión Europea. Se analizaron muestras de diferentes tipos de frutos cítricos (naranjas, limones y mandarinas), llevando a cabo estudios de recuperación en los mismos. Se obtuvieron recuperaciones comprendidas entre el 85% y el 115% en todos los casos. Las muestras fueron analizadas además mediante un método cromatográfico con el objetivo de validar el método.

El método desarrollado supone una mejora sustancial de los optosensores en flujo continuo, consiguiendo por primera vez la separación y determinación de cuatro analitos en un mismo análisis. Esto es posible no sólo gracias a la inserción de una cantidad adicional de soporte sólido en la célula de flujo, sino también mediante la correcta selección y optimización de las disoluciones empleadas como portador y eluyentes. Al realizarse la separación y la detección en la propia célula de flujo del detector, la configuración propuesta combina las ventajas de los optosensores y de la SPE en un sistema más simple, eliminando el uso de accesorios extra como minicolumnas o cartuchos, y evitando así fenómenos de dispersión y dilución asociados a las

conexiones y tubos situados entre la columna de separación el detector. Esta estrategia proporciona buenos parámetros de sensibilidad y selectividad, no observándose diferencias significativas cuando se analizan muestras reales mediante el método descrito y un método cromatográfico.

Este trabajo demuestra, junto con el descrito anteriormente, la utilidad de los optosensores en flujo para el análisis de rutina de unos pocos analitos, presentando ciertas ventajas en términos de simplicidad, costes y consumo de disolventes frente a los métodos cromatográficos.

“Novel sequential separation and determination of a quaternary mixture of fungicides by using an automatic fluorimetric optosensor”

Abstract

A versatile flow-through multi-optosensor is proposed for the separation and spectrofluorimetric determination of mixtures of four widely used pesticides: carbendazim, thiabendazole, carbaryl and o-phenylphenol at $\mu\text{g g}^{-1}$ levels in fruits. The flow system is based on the online preconcentration and separation of the pesticides on a solid sensing microzone, followed by the sequential measurement of their native fluorescence. The separation of the pesticides takes place on a solid support located in the same flow cell, on which analytes are temporarily immobilized and separated from the matrix due to their different retention/desorption kinetics when they interact with the C_{18} silica gel microbeads. Suitable analytical parameters were obtained for the selected analytes, with method detection and quantification limits ranging between 0.1–0.5 and 0.2–1.6 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectively. These values comply with the maximum residue limits (MRLs) established by the Codex Alimentarius for these commodities; in addition, carbendazim, thiabendazole and ortho-phenylphenol comply with the MRLs of The European Union. The developed method was applied to the analysis of citrus fruits by performing recovery studies. Recoveries between 85% and 115% were obtained in all cases, and the results were confirmed by a liquid chromatography–mass spectrometry reference method.

Keywords

SIA, automation, pesticide, carbendazim, thiabendazole, carbaryl, ortho-phenylphenol, citrus fruits, solid-phase spectroscopy.

Introduction

Pesticides, including insecticides, herbicides and fungicides, are widely used during all cultivation stages, to obtain more productive and resistant crops. Fungicides are added to crops after their harvest; specifically, they are post-harvest pesticides that prevent the attack of species such as fungi, bacteria, insects and rodents, among others. However, the overuse of these products has become a food safety problem, since most of them are persistent compounds that accumulate in soil and water, which involves the risk of these fungicides entering the food chain. Therefore, it is necessary to evaluate the potential toxicity of these compounds, especially for humans (Mostafalou and Abdollahi 2017). Carbendazim (CBZ), thiabendazole (TBZ), carbaryl (CB) and o-phenylphenol (OPP) are four fungicides widely used in the post-harvest treatment of fruits and vegetables (Ortelli et al. 2005). CBZ is a metabolite of benomyl, and both substances are toxic compounds for the male reproductive system of mammals (Preeti et al. 2015). TBZ and OPP have proven to be harmful to liver cells, causing liver injury (Nakagawa et al. 1992; Preeti et al. 2015) as well as CB, a carbamate which has been related to several types of cancer and also appears to cause metabolic disorders, like hyperglycaemia and metabolic syndrome (Karami-Mohajeri and Abdollahi 2011; Mostafalou and Abdollahi 2017).

Methods for pesticides determination in food usually involve multiresidue analysis methods based on chromatographic techniques, both liquid (Fenoll et al. 2010; Charalampous et al. 2015; Saito-Shida et al. 2016; Stachniuk and Fornal 2016) and gas chromatography (Koesukwiwat et al. 2011; Facco et al. 2015; Grande-Martínez et al. 2016; He et al. 2017) coupled to mass spectrometry as detection technique. They provide high selectivity and sensitivity levels but require highly qualified operators and very expensive equipment. Therefore, it is necessary to develop simple, high-throughput and cost-effective methodologies for monitoring the presence of several of these compounds in different samples. This can be achieved by the use of spectroscopic detection techniques, especially fluorimetry, coupled to flow-based methodologies (Llorent-Martínez et al. 2011): Flow Injection Analysis (FIA), Sequential Injection Analysis (SIA), Multisyringe Flow Injection Analysis (MSFIA) or Multicommutated Flow Injection Analysis (MCFIA). The main aim of these methodologies is to automate operations usually carried out by the analyst, hence improving precision, reducing the analysis time and offering advantages such as fast and low-cost methods with low reagents consumption and waste generation, according to the principles of green chemistry (Melchert et al. 2012). The weakness of these methodologies is usually their lower selectivity compared to chromatographic methods. However, selectivity is critically enhanced when a suitable solid support is placed in the detection flow cell (Flores et al. 2007a; Llorent-Martinez et al. 2007; Chouhan et al. 2010; Oliveira et al. 2012; Jiménez-López et al. 2014). This methodology, called flow-through optosensor or optosensing, is considered a novel approach of online solid-phase

extraction (SPE) (Rocha et al. 2018).

Optosensing is based on the insertion of a solid phase – that interacts specifically with the target analyte – in the flow cell, allowing the temporary retention and online preconcentration of the analyte on the solid support, with the analytical signal recorded directly on the solid beads. In this way, the analytical signal is improved by avoiding dilution and dispersion phenomena. The most important advantage of the use of solid supports is the capability to separate the analyte from other co-existing interfering compounds due to their different interaction degree with the solid support. In addition, mixtures of analytes can be separated when a suitable amount of solid support is placed before the sensing zone. The separation is achieved due to the different sorption rate of the target compounds and their affinity for the solid support. This kind of online SPE is usually carried out through the insertion of a mini-column before the detector, allowing the separation and determination of a few analytes (Flores et al. 2007b; Gilbert-López et al. 2007).

A novel and less exploited alternative consists of replacing the mini-column with an additional amount of solid support above the sensing zone of the flow cell. In this way, the advantages of optosensing and SPE are combined by performing the separation and detection of the analytes simultaneously in the flow cell, minimizing the use of toxic solvents and solid support amounts. Up to now, only biparameter sensors (excluding those using mini-columns) have been described (Salinas-Castillo et al. 2004; Piccirilli and Escandar 2010; Llorent-Martínez et al. 2015). In foodstuffs, two approaches have been

reported: the use of a multi-branch flow cell to pack two different solid supports (Ge et al. 2012) and the use of a conventional flow cell (Llorent-Martínez et al. 2013).

This work reports, for the first time, a simple flow system based on the combination of SIA with fluorimetric detection for the simultaneous determination of four fungicides – CBZ, TBZ, CB and OPP – in different citrus fruits. A straightforward design for the online separation is achieved by incorporating an improved optosensor due to the optimization of the solid support amount and the elution conditions, without involving the use of additional devices in the manifold. Analytes were extracted from fruits by a QuEChERS method (Anastassiades et al. 2003), and the accuracy of the results was validated with a liquid chromatography–mass spectrometry (HPLC-MS) reference method (Robles-Molina et al. 2014).

Materials and methods

Reagents and solutions

All solutions were prepared with analytical reagent-grade chemicals and Milli-Q water. Phosphate buffer was prepared daily with sodium dihydrogen phosphate and potassium hydroxide (Panreac, Barcelona, Spain). CBZ, TBZ, CB, OPP, imazalil, simazine, morestan, aminocarb, carbofuran, thiamethoxam and clothianidin were purchased from Sigma (Alcobendas, Madrid, Spain), and individual stock solutions of 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ were prepared in methanol (Panreac, Barcelona, Spain). The solutions remained stable for at least a month

when stored in the dark at 4°C. Working solutions were prepared daily by dilution in phosphate buffer (0.1 mol L⁻¹; pH 6.5).

Acetonitrile, sodium chloride and anhydrous magnesium sulphate were provided by Panreac (Barcelona, Spain). Primary secondary amine (PSA), graphitized carbon and Z-Sep+ were bought from Supelco (Bellefonte, PA, USA). C₁₈-bonded phase silica gel beads (Waters, Milford, MA, USA) had a particle size of 55–105 µm.

Apparaatus and Instruments

An FIALab-3500 automatic analyser (FIALab Instruments, Inc., Bellevue, WA, USA) was used, equipped with two 5-mL syringe pumps, a peristaltic pump, a 1-mL holding coil and a 8-port multi-position valve. All these components were controlled by a computer with FIALab 5.0 software. The analyser was connected to a Cary-Eclipse Luminescence Spectrometer (Varian Inc., Mulgrave, Australia). A 176.752-QS Hellma flow cell (25 µL inner volume and 1.5 mm light path length) was used; it was filled with C₁₈ solid support microbeads and its outlet was blocked with glass wool to prevent bead displacement. All tubing (0.8 mm i.d. except 1.5 mm to aspirate carrier solution) was made of polytetrafluoroethylene (PTFE). The manifold is shown in Figure 1. For the sake of clarity, only the components of the FIALab used in this method are represented.

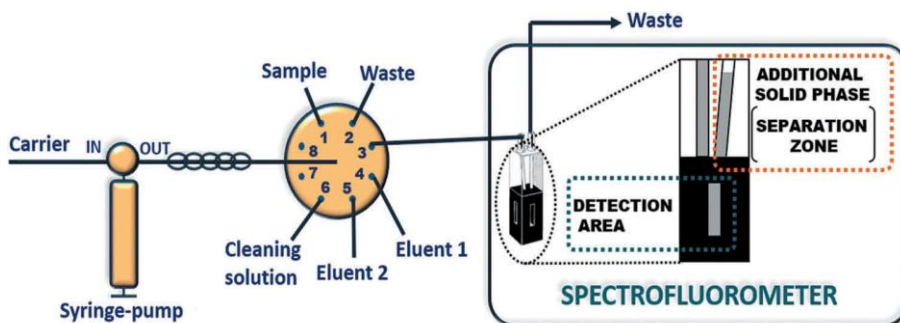


Figure 1. SIA manifold. Carrier = acetonitrile solution (10% v:v). Eluent 1 = acetonitrile 25%. Eluent 2 = acetonitrile 50%.

A T18-basic Ultra-Turrax from IKA (Staufen, Germany) was used to homogenize fruit samples. A Milli-Q-Plus ultra-pure water system from Millipore (Milford, MA, USA), a Sonorex Digital 10 P ultrasonic bath (Bandelin Electronic, Berlin, Germany) and a pH-meter Crison GLP 21 (Crison Instruments, Barcelona, Spain) were also used.

A high-performance liquid chromatography–electrospray–ion trap–mass spectrometry (HPLC-ESI-IT-MS) method was used as reference. The analytes were separated by using an HPLC system (Agilent Series 100, Santa Clara, CA, USA), consisting of vacuum degasser, autosampler and a binary pump, equipped with a reversed-phase C₁₈ analytical column of 50 × 4.6 mm and 1.8 μm particle size (Kinetex, Phenomenex, Torrance, CA, USA). Two mobile phases were used: (A) water with 0.1% formic acid (v/v); (B) acetonitrile with 0.1% formic acid (v/v). A two-step linear gradient programme was used: 10% B to 100% B in 30 min, and then back to 10% B in 35 min. The HPLC system was connected to an ion trap mass spectrometer (Esquire 6000, Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA) equipped with an electrospray

interface. Analytes were determined in positive-ion mode $[M + H]^+$: m/z 192 for CBZ, m/z 224 for CB, m/z 202 for TBZ and m/z 171 for OPP. Sample solutions were filtered through 0.45 μm PTFE membrane filters before analysis, and 10 μL of sample was injected.

Sample treatment

Fruit samples (lemons, oranges and mandarins) were obtained from local markets. Before the extraction procedure, approximately 500 g of each type of fruit was ground (whole fruit pieces were taken, including rind) and homogenized with an Ultra-Turrax blender. The original QuEChERS method (Anastassiades et al. 2003) was selected for the extraction of the fungicides from fruit samples. This method involved a liquid–liquid extraction with acetonitrile followed by a dispersive clean-up step using primary–secondary amine. The obtained extract was diluted 25-fold with phosphate buffer before analysis by the proposed method.

General procedure

The procedure detailed below is presented in Table 1:

- a. 100 μL of carrier solution (10% acetonitrile:water, v:v) and 400 μL of sample solution were aspirated and pumped towards the waste to avoid contamination with the previous sample.
- b. 2100 μL of carrier solution and 300 μL of sample solution were aspirated and pumped towards the flow cell. The online separation of the analytes took place on the solid support placed inside the flow

cell. In this step, CB and OPP remained retained at the top of the solid support (above the detection area). CBZ, followed by TBZ, was eluted by the carrier solution (10% acetonitrile:water, v:v) and their signals were recorded.

- c. 1400 μL of eluent 1 (25% acetonitrile:water, v:v) was aspirated and dispensed to the flow cell. In this way, CB was eluted and its signal was recorded in the detection area, whereas OPP remained retained on the upper part of the solid support.
- d. Finally, 1100 μL of eluent 2 (50% acetonitrile:water, v:v) was introduced in the system to elute OPP.
- e. When real samples were analysed, an extra-step was required: 500 μL of 70% acetonitrile:water (v:v) was used to regenerate the solid support. This step was performed once every three analyses.

Calibration standards and samples were analysed in triplicate. The analytical signal was expressed as peak height mean values.

Table 1. Sequence of steps for the separation procedure.

Stage	Step	Port selection	Flow rate ($\mu\text{L s}^{-1}$)	Operation	Description
(a)	1	–	100	Aspirate 100 μL	SP-1 in valve IN position. Aspirate carrier solution and return SP-1 to valve OUT position
	2	1	100	Aspirate 300 μL	Aspirate standard or sample solution
	3	2	100	Empty	Empty SP-1 into waste
(b)	4	–	100	Aspirate 2100 μL	SP-1 in valve IN position. Aspirate carrier solution and return SP-1 to valve OUT position
	5	1	100	Aspirate 300 μL	Aspirate standard or sample solution
	6	3	15	Empty	Empty SP-1 into the flow cell in the detector
(c)	7	4	100	Aspirate 1400 μL	Aspirate eluent 1
	8	3	15	Empty	Empty SP-1 into the flow cell in the detector
(d)	9	5	100	Aspirate 1100 μL	Aspirate eluent 2
	10	3	15	Empty	Empty SP-1 into the flow cell in the detector
(e) ^a	11	6	100	Aspirate 500 μL	Aspirate cleaning solution
	12	3	15	Empty	Empty SP-1 into the flow cell in the detector

^aThis step was only used when real samples were analysed; SP = syringe pump.

Results and discussion

Spectral and instrumental parameters

The spectral parameters were optimized for each analyte separately. Preliminary experiments indicated the suitability of C₁₈ silica gel for the target compounds, so all experiments were performed using this solid support. The selected excitation/ emission wavelengths were 258/307, 296/361, 280/334 and 240/418 nm for CBZ, TBZ, CB and OPP, respectively. A multi-wavelength fluorescence detection mode was used, allowing the simultaneous recording of four different pairs of excitation/emission wavelengths, hence obtaining the maximum sensitivity for each analyte.

Instrumental parameters were also optimized to improve the signal-to-background ratio, especially for CBZ, which presented the lowest sensitivity. The photomultiplier tube voltage was studied between 400 and 1000 V, selecting 700 V as the most appropriate. Instrument excitation and emission slit widths between 5 and 20 nm were tested, selecting 5 and 10 nm excitation/emisión slit widths as most appropriate.

Separation of the analytes on the solid support

The fluorescence spectral overlapping of TBZ, CBZ, CBR and OOP makes it impossible to quantify them without a previous separation. Therefore, their online separation prior to the detection area is mandatory.

The separation of the four analytes was achieved by optimizing the amount of solid support in the flow cell and the nature and concentration of carrier and eluting solutions. These two aspects are critical to achieve different sorption/ desorption kinetics for each analyte when interacting with the C₁₈ microbeads, which leads to their separation and selective quantification.

First, different amounts of solid support (50–80 mg) were tested. These amounts not only fill the detection area of the flow cell but also the zone above the irradiated area, in which the separation takes place prior to the detection. The total separation of the analytes could not be achieved for low amounts of solid support. However, the complete separation of all four analytes was achieved using 77 mg of C₁₈ microbeads, which corresponded to a height of 35 mm above the detection zone.

For the selection of the carrier and eluting solutions, aqueous solutions of methanol, ethanol and acetonitrile were tested. Methanol:water mixtures usually provide the best results when C₁₈ is used as solid support. However, in this study, only CB and OPP could be properly separated using different percentages of methanol, while TBZ and CBZ peaks overlapped (Figure 2a–b). Although the degree of separation was improved by using very low proportions of methanol (<10%), the sample throughput was not acceptable. Similar results were obtained with ethanol:water solutions. However, the complete separation of the analytes, along with satisfactory sample throughput, was achieved with acetonitrile:water solutions.

The percentage of acetonitrile in the carrier solution was tested in the range of 5–30%, observing that a 10% acetonitrile solution allowed the separation and elution of TBZ and CBZ. Next, the percentage of acetonitrile was also optimized for each eluting solution, between 15% and 50% acetonitrile. After careful optimization, CB and OPP could be separated and detected by using two eluting solutions: 25% for CB and 50% for OPP.

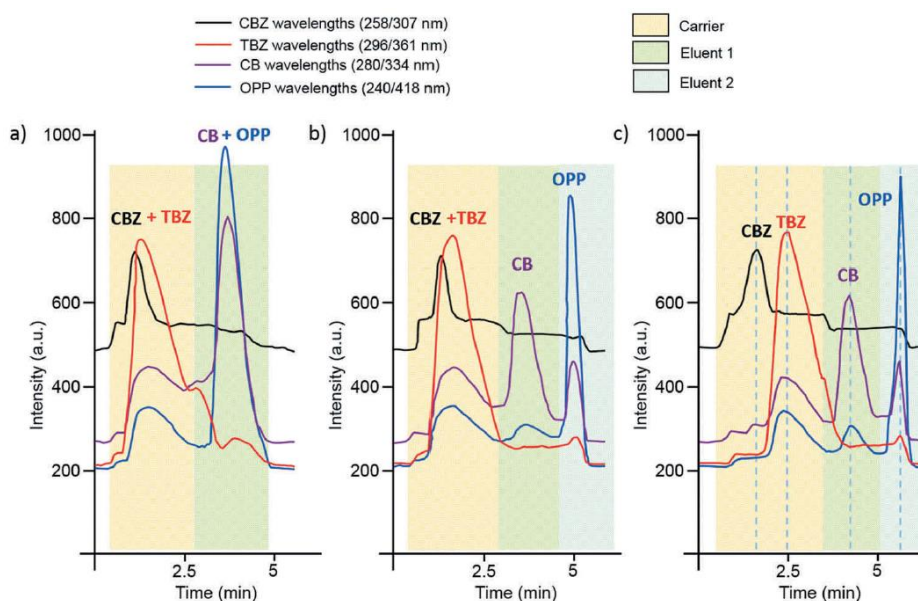


Figure 2. SIA profile obtained for (a) carrier: 20% MeOH; eluent 1: 50% MeOH), (b) carrier: 10% MeOH; eluent 1: 25% MeOH; eluent2: 50% MeOH) and (c) optimum conditions (carrier: 10% acetonitrile; eluent 1: 25% acetonitrile; eluent 2: 50% acetonitrile).

Figure 2c shows the flow profile under the optimum conditions at concentration levels of $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ for CBZ, TBZ and CB; and $0.25 \mu\text{g mL}^{-1}$ for OPP. Signals of each analyte were recorded at its maximum peak height, marked by the discontinuous line in Figure 2c, where the

separation achieved by the proposed methodology can be observed: CBZ elutes before TBZ reaches the detection zone, and the same applies to the other target analytes. Hence, this separation allows to recording each analyte without any interference from the other analytes.

Sample pH

The effect of pH can be observed in Figure 3. A multi-standard solution ($2 \mu\text{g mL}^{-1}$ of CBZ, TBZ and CB, and $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ of OPP) was prepared to carry out the study. CB and OPP signals were not affected at $\text{pH} < 5$; TBZ signal increased gradually, whereas CBZ signal significantly decreased. In addition, pH values > 8 decreased the signal of all the analytes. Based on these results, we checked the effect of using a buffer solution, as the extracts of real samples (citrus fruits) had low pH values that would interfere in the analytical signals. Two different buffers were tested in the range of 5–8 pH at a 0.1 mol L^{-1} concentration: sodium dihydrogen phosphate/potassium hydroxide buffer (at pH 5.5, 6.0, 6.5, 7 and 8) and acetic acid/sodium acetate buffer at pH 5.0, 5.5 and 6.0. In both cases, the signals recorded were similar no matter the pH value. Therefore, a 0.1 mol L^{-1} sodium dihydrogen phosphate/potassium hydroxide solution at pH 6.5 was selected as optimum.

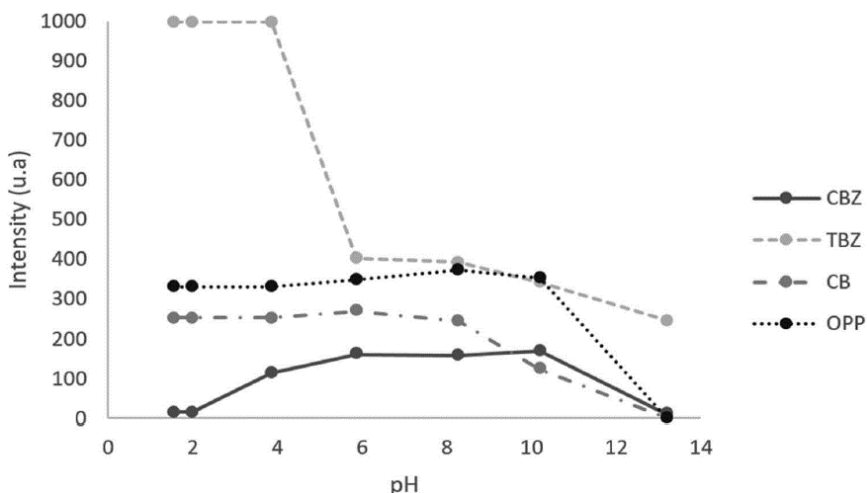


Figure 3. Comparative graphic showing the effect of pH on the analytical signal for each analyte.

SIA parameters

The optimized flow parameters were sample, carrier and eluents volumes, along with the flow rate. A multi-standard solution ($2 \mu\text{g mL}^{-1}$ of CBZ, TBZ and CB and $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ of OPP) was prepared to carry out the optimization.

One of the advantages of optosensors is the signal increment obtained when a high volume of sample is used. This effect is due to the preconcentration of the analytes in the solid support. Nevertheless, large sample volumes can produce compaction of the solid support and, consequently, overpressures, as well as a decrease in the sample throughput. The sample volume was studied in the range of 100–600 μL , selecting 300 μL as a compromise between sensitivity and sampling frequency.

The volumes of carrier and eluting solutions were optimized, selecting the minimum ones that provided the complete elution of the analytes in order to decrease analyses time, hence improving the sample throughput. Volumes of 2100, 1400 and 1100 μL were selected for carrier, eluent 1 and eluent 2, respectively. On the other hand, although the baseline was completely regenerated, in preliminary repeatability studies, we observed that after several sample runs (5–10), the signal decreased about 2–5% after each injection. This was probably due to some components of the matrix being retained on the solid support. In order to avoid this, a clean-up and regeneration step with 500 μL of 70% acetonitrile:water (v:v) was added to the flow schedule used to regenerate the solid support, also, enlarging the lifetime of the sensor (more than 100 sample determinations can be performed without replacing the solid phase). This step was performed once every three analyses of real samples.

The effect of the flow rate was also studied. Due to the presence of the solid support in the cell, low flow rates had to be used to avoid overpressure problems due to the compaction of the solid support. Therefore, 15 $\mu\text{L s}^{-1}$ (the largest flow rate without pressure problems) was selected when solutions were pumped through the solid support. For the remaining steps (no overpressure problems), 100 $\mu\text{L s}^{-1}$ was selected to reduce operation times.

Extraction procedure

Several QuEChERS methods (González-Curbelo et al. 2015) were tested, always following these steps: 10 g of puree sample (fortified

with 2 $\mu\text{g g}^{-1}$ of CBZ, TBZ and CB and 1 $\mu\text{g g}^{-1}$ of OPP) were weighed directly into a 50-mL PTFE centrifuge tube, and 10 mL of acetonitrile was added. Then, the tube was closed and vigorously shaken for 1 min by hand, followed by the addition of the appropriate amount of specified salts, repeating the shaking process for 1 min. Later, the tube was centrifuged at 3700 rpm for 3 min for phases' separation. An aliquot of 5 mL acetonitrile phase (supernatant) was aspirated and placed into a 15-mL centrifuge tube, where clean-up reagents were added. The tube was vigorously shaken for 30 s by hand and centrifuged again at 3700 rpm for 3 min. The obtained extract was diluted with buffer solution prior to analysis. In addition to the original QuEChERS method, three modifications were tested: citrate buffer QuEChERS, which uses a pH 5 extraction medium; Z-Sep+ version, using a zirconium-oxide based sorbent (Z-Sep+) as clean-up reagent; and graphitized carbon version, adding a small amount of graphitized carbon to the clean-up step. Table 2 shows the specific reagents used in each QuEChERS procedure. Although the most appropriate modification a priori was the citrate buffer – final extracts had neutral pH and no additional buffer was required – this modification was rejected because interferences were observed during analysis. The use of graphitized carbon in the clean-up step improved pigment sorption, but the recoveries of the analytes were lower than using other methods. Finally, similar results were obtained with the original QuEChERS and the Z-sep+ modification. Hence, the original version was selected avoiding the use of expensive reagents.

Calibration parameters and interference study

Once all the above parameters were optimized, we proceeded to study the linearity of the proposed method. Different standard solutions were prepared and analysed in a range of concentration from 0.1 to 20 $\mu\text{g g}^{-1}$ for CBZ, TBZ and CB, and from 0.5 to 15 $\mu\text{g g}^{-1}$ for OPP. As shown in Table 3, the proposed method provided satisfactory analytical parameters, with linear ranges of 1.6–20, 0.3–15, 0.5–15 and 0.2–7 $\mu\text{g g}^{-1}$ for CBZ, TBZ, CB and OPP, respectively. The detection and quantification limits for each analyte have been calculated according to the IUPAC criterion by the estimation of the concentration of analyte that produced an analytical signal equal to 3 and 10 times, respectively, the standard deviation of the fluorescence signal of blank extracts from real samples (analysed beforehand by HPLC to confirm the absence of the analytes). Repeatability was studied by the analysis of 10 samples containing 10 $\mu\text{g mg}^{-1}$ for CBZ, TBZ CB and 5 $\mu\text{g mg}^{-1}$ for OPP, obtaining RSD values lower than or equal to 5%. The resulting sampling frequency was nine samples per hour. The high sensitivity observed permitted dilution of the QuEChERS extract. We checked the absence of matrix-effects by preparing two calibration graphs: in solvent (external calibration) and in extracts from real samples (absence of analytes was confirmed by HPLC analysis). The variation in the slopes of the calibration graphs was less than 5%, showing the absence of matrix effect. Therefore, external calibration was performed, using standard least-squares calibration.

Table 2. Different modified QuEChERS tested.

Tested method	QuEChERS step		
	Solvent extraction	Liquid-liquid partition	Clean-up
Original QuEChERS	10 mL Acetonitrile	4 g MgSO ₄ 1.67 g NaCl	750 mg MgSO ₄ 250 mg PSA sorbent
Citrate buffered QuEChERS	10 mL Acetonitrile (0.3 NaOH)	4 g MgSO ₄ 1 g NaCl 1 g Na ₃ [(C ₃ H ₅ O(COO) ₃] ₂ ·2H ₂ O 0.5 g Na ₂ H[(C ₃ H ₅ O(COO) ₃] ₂ ·1.5H ₂ O	750 mg MgSO ₄ 250 mg PSA sorbent
Zsep+ version	10 mL Acetonitrile	4 g MgSO ₄ 1.67 g NaCl	200 mg MgSO ₄ 800 mg Zsep+ sorbent
Graphitized carbon version	10 mL Acetonitrile	4 g MgSO ₄ 1.67 g NaCl	750 mg MgSO ₄ 250 mg PSA sorbent 40 mg graphitized carbon

Table 3. Analytical parameters.

Parameter	CBZ	TBZ	CB	OPP
Linear dynamic range/$\mu\text{g g}^{-1}$	1.6–20	0.3–15	0.5–15	0.2–6.2
Calibration graph				
Intercept	-0.0897	-81.613	-22.134	1.7101
Slope/$\text{g } \mu\text{g}^{-1}$	18.106	53.075	29.289	87.928
Correlation coefficient	0.9993	0.9996	0.99912	0.9995
Detection limit/$\mu\text{g g}^{-1}$	0.5	0.1	0.2	0.1
Quantification limit/$\mu\text{g g}^{-1}$	1.6	0.3	0.5	0.2
Intra-day RSD (%) (n = 10)	5.0 ^a	2.8 ^a	2.6 ^a	4.7 ^b
Sampling frequency/h^{-1}	9	9	9	9

^aFor a concentration level of 10 $\mu\text{g g}^{-1}$.

^bFor a concentration level of 5 $\mu\text{g g}^{-1}$.

In real citrus fruit samples, other pesticides can be used during the different cultivation and storage steps. Therefore, an interference study was performed by the analysis of standard solutions of analytes spiked with potential interfering pesticides. Some of them, including imazalil and carbofuran, are among the most widely detected in citrus fruits (Ortelli et al. 2005), whereas thiamethoxam and clothianidin are the most used neonicotinoids, which are the most widely used pesticides nowadays (Ruiz-Medina et al. 2018). The results are shown in Table 4, where tolerance level is defined as the maximum amount of interfering species which does not alter the analytical signal more than $\pm 2\sigma$, being

σ the standard deviation for each analyte determination (three replicate analysis). As can be seen, the obtained values are relatively high, thus showing the selectivity of the proposed method as a result of the use of the solid support inside the flow cell.

Table 4. Interference study.

Foreign species	Tolerated interference/analyte (w/w) ratio ^a			
	CBZ	TBZ	CB	OPP
Imazalil	1000 ^b	50 ^b	20	100 ^b
Simazine	1000 ^b	50 ^b	20	100 ^b
Morestan	1000 ^b	100 ^b	20	100 ^b
Aminocarb	1000 ^b	1000 ^b	20	80
Carbofuran	100 ^b	100 ^b	20	50
Thiametoxam	100 ^b	100 ^b	100 ^b	200 ^b
Clothianidin	100 ^b	100 ^b	100 ^b	200 ^b

^aCBZ, TBZ and CB concentration = 5 $\mu\text{g g}^{-1}$; OPP concentration = 2.5 $\mu\text{g g}^{-1}$.

^bMaximum ratio tested.

Applications

Several citrus fruits (lemons, oranges and mandarins) were analysed. First, they were analysed by both the proposed method and the HPLC-MS reference method to check if the analytes were present at detectable levels. Samples did not contain the target compounds, so

recovery experiments were performed. This study was carried out by spiking the samples before sample extraction with standard solutions of the pesticides at different concentration levels (similar to the maximum residue levels established for each pesticide). The spiked samples were allowed to stand for 24 h at room temperature, and then the extraction and the analytical procedure were performed. Good recovery values (expressed as a mean of three determinations within the same day) between 85% and 115% were obtained in all cases (Tables 5–7). Additionally, the experimental results were subjected to F-criterion and t-test at 5% significance level, in order to compare statistically the recoveries obtained with both the proposed and the reference methods. The experimental values were always lower than the theoretical ones (4.30 for Student's t, and 19.00 for Fisher's F), which proved the absence of significant differences between both methods.

Table 5. Analytical applications: lemons.

	Added ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Recovery \pm RSD (%) ^a (Proposed)	Recovery \pm RSD (%) ^a (HPLC)	T _{cal} ^b	F _{cal} ^c
Lemon 1					
CBZ	2	107 \pm 3	93 \pm 2	3.57	5.33
	5	88 \pm 2	86 \pm 5	0.99	4.34
	10	94 \pm 2	87 \pm 2	3.26	3,88
TBZ	2	92 \pm 4	89 \pm 3	0.50	5.21
	5	92 \pm 3	92 \pm 3	0.42	3.00
	10	102 \pm 2	97 \pm 1	2.71	12.00
CB	2	106 \pm 4	99 \pm 2	1.51	8.62
	5	111 \pm 2	101 \pm 2	3.51	3.00
	10	108 \pm 2	107 \pm 1	0.36	6.75
OPP	1	108 \pm 4	105 \pm 5	0.61	1.53
	2	99 \pm 2	102 \pm 2	1.68	3.00
	5	106 \pm 1	110 \pm 4	1.66	9.18
Lemon 2					
CBZ	3	108 \pm 5	105 \pm 3	0.51	8.33
	7	101 \pm 1	99 \pm 1	1.09	3.70
	15	99 \pm 3	101 \pm 2	0.47	8.47
TBZ	3	107 \pm 4	101 \pm 5	1.18	1.92
	7	98 \pm 3	100 \pm 2	0.30	11.02
	15	101 \pm 2	99 \pm 1	0.63	8.54
CB	3	115 \pm 2	112 \pm 4	1.13	1.78
	7	102 \pm 2	98,7 \pm 2,2	1.49	1.92
	15	100,6 \pm 2,4	99,4 \pm 1,1	0,43	15.19
OPP	0,6	95,0 \pm 3,5	101,7 \pm 4,9	1.59	1.33
	3	104,7 \pm 3,6	103,0 \pm 3,2	0.37	3.76
	6	97,8 \pm 4,4	102,3 \pm 3,4	0.88	4.60

^a Mean of three determinations \pm RSD; ^b Theoretical value $t = 4.30$; $p = 0.05$.

^c Theoretical value $F = 19.00$; $p = 0.05$.

Table 6. Analytical applications: oranges.

	Added ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Recovery \pm RSD (%) ^a (Proposed)	Recovery \pm RSD (%) ^a (HPLC)	T _{cal} ^b	F _{cal} ^c
Orange 1					
CBZ	2	98 \pm 4	97 \pm 3	0.21	4.22
	5	100 \pm 4	92 \pm 3	1.89	6.91
	10	102 \pm 2	94 \pm 2	3.14	5.29
TBZ	2	92 \pm 2	95 \pm 2	1.58	3.00
	5	84 \pm 3	90 \pm 4	1.97	1.08
	10	101 \pm 2	103 \pm 1	0.72	6.75
CB	2	98 \pm 3	102 \pm 2	1.07	5.33
	5	101 \pm 1	99 \pm 2	1.90	1.78
	10	102 \pm 1	105 \pm 1	3.05	1.55
OPP	1	84 \pm 1	87 \pm 4	2.15	17.36
	2	99 \pm 2	94 \pm 3	1.82	2.93
	5	85 \pm 2	86 \pm 1	0.54	12.00
Orange 2					
CBZ	3	96 \pm 3	107 \pm 4	2.96	1.69
	7	102 \pm 3	98 \pm 3	1.06	2.30
	15	96 \pm 1	98 \pm 2	1.33	1.38
TBZ	3	95 \pm 3	92 \pm 2	0.85	6.75
	7	103 \pm 3	98 \pm 2	1.52	7.52
	15	102 \pm 2	102 \pm 3	0.18	1.37
CB	3	92 \pm 3	95 \pm 3	0.83	3.00
	7	102 \pm 3	98 \pm 3	1.18	2.50
	15	101 \pm 1	101 \pm 2	0.31	1.13
OPP	0,6	105 \pm 2	108 \pm 2	1.64	2.08
	3	108 \pm 5	106 \pm 4	0.17	4.69
	6	102 \pm 4	97 \pm 2	1.07	12.00

^a Mean of three determinations \pm RSD. ^b Theoretical value $t = 4.30$; $p = 0.05$.

^c Theoretical value $F = 19.00$; $p = 0.05$.

Table 7. Analytical applications: mandarins.

	Added ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Recovery \pm RSD (%) ^a (Proposed)	Recovery \pm RSD (%) ^a (HPLC)	T _{cal} ^b	F _{cal} ^c
Mandarin 1					
CBZ	2	97 \pm 3	94 \pm 4	0.69	1.92
	5	92 \pm 4	87 \pm 2	1.16	10.70
	10	90 \pm 2	88 \pm 2	1.05	3.00
TBZ	2	95 \pm 3	98 \pm 2	1.05	3.00
	5	96 \pm 1	102 \pm 3	3.87	18.10
	10	103 \pm 1	103 \pm 2	1.23	1.78
CB	2	102 \pm 1	100 \pm 3	1.43	17.81
	5	99 \pm 2	92 \pm 3	3.48	1.36
	10	109 \pm 1	104 \pm 1	2.85	10.79
OPP	1	87 \pm 2	91 \pm 2	2.10	3.00
	2	86 \pm 1	85 \pm 1	1.47	3.00
	5	86 \pm 3	85 \pm 6	0.25	1.77
Mandarin 2					
CBZ	3	106, \pm 3	100 \pm 4	1.62	1.69
	7	99 \pm 1	98 \pm 4	0.41	4.94
	15	102 \pm 2	99 \pm 2	1.46	2.48
TBZ	3	88 \pm 2	90 \pm 4	0.75	1.78
	7	102 \pm 3	103 \pm 3	0.29	3.28
	15	99 \pm 2	99 \pm 1	0.11	11.26
CB	3	94 \pm 3	95 \pm 4	0.27	1.69
	7	103 \pm 4	102 \pm 3	0.28	5.47
	15	101 \pm 2	103 \pm 3	0.72	1.01
OPP	0,6	102 \pm 2	95 \pm 2	3.44	2.08
	3	105 \pm 7	103 \pm 4	0.19	11.02
	6	98 \pm 3	97 \pm 3	0.34	4.15

^a Mean of three determinations \pm RSD. ^b Theoretical value t = 4.30; p = 0.05.

^c Theoretical value F = 19.00; p = 0.05.

Conclusions

In this work, we propose, for the first time, a novel flow-through optosensor for the online separation and sequential determination of mixtures of four pesticides in fruits. The separation is achieved by the use of an additional amount of solid support in the flow cell, above the detection area, as well as the optimization of elution conditions. This approach avoids the use of extra devices such as minicolumns, combining the advantages of optosensing and SPE in a simpler system that eliminates any interface between the separation column and the detector, hence avoiding dilution and dispersion phenomena. This strategy provides good selectivity and sensitivity, observing no significant differences when real samples were analysed by the method proposed and a reference chromatographic method. The detection limits obtained fulfilled the MRLs established by the Codex Alimentarius, hence allowing its application to the selected fruits. The proposed SIA optosensor fulfils the principles of green chemistry, showing advantages such as simplicity, low cost, high sample frequency, minimum sample and reagents consumption, and high precision. However, the proposed approach is only suitable for a reduced number of pesticides, and positive results should be confirmed by HPLC-MS, which is the usual methodology used in multi-residue analysis of pesticides.

Funding

This work was supported by the 'Ministerio de Economía y

Competitividad' under the project CTQ2016-7511-R).

References

- Anastassiades M, Lehotay SJ, Štajnbaher D, Schenck FJ. 2003. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "Dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. *J AOAC Int.* 86:412–431.
- Charalampous AC, Miliadis GE, Koupparis MA. 2015. A new multiresidue method for the determination of multiclass pesticides, degradation products and PCBs in water using LC–MS/MS and GC–MS (n) systems. *Int J Environ Anal Chem.* 95:1283–1298.
- Chouhan RS, Vinayaka AC, Thakur MS. 2010. Chemiluminescence based technique for the detection of methyl parathion in water and fruit beverages. *Anal Methods.* 2:924–928.
- Facco JF, Martins ML, Bernardi G, Prestes OD, Adaime MB, Zanella R. 2015. Optimization and validation of a multiresidue method for pesticide determination in maize using gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Anal Methods.* 7:359–365.
- Fenoll J, Hellín P, Martínez CM, Flores P. 2010. Multiresidue analysis of pesticides in vegetables and citrus fruits by LC–MS–MS. *Chromatographia.* 72:857–866.
- Flores JL, Diaz AM, Fernandez de Cordova ML. 2007a. Determination of azoxystrobin residues in grapes, musts and wines with a multicommuted flow-through optosensor implemented with photochemically induced fluorescence. *Anal Chim Acta.* 585:185–

191.

- Flores JL, Fernandez de Cordova ML, Diaz AM. 2007b. Flow-through optosensor combined with photochemically induced fluorescence for simultaneous determination of binary mixtures of sulfonamides in pharmaceuticals, milk and urine. *Anal Chim Acta*. 600:164–171.
- Ge SG, Zhao PN, Yan M, Zang DJ, Yu JH. 2012. Multi-branch chemiluminescence-molecular imprinting sensor for sequential determination of carbofuran and omethoate in foodstuff. *Anal Methods*. 4:3150–3156.
- Gilbert-López B, Llorent-Martínez EJ, Ortega-Barrales P, Molina-Díaz A. 2007. Development of a multicommuted flow-through optosensor for the determination of a ternary pharmaceutical mixture. *J Pharm Biomed Anal*. 43:515–521.
- González-Curbelo M, Socas-Rodríguez B, Herrera-Herrera AV, González-Sálamo J, Hernández-Borges J, Rodríguez-Delgado M. 2015. Evolution and applications of the QuEChERS method. *TrAC – Trends Anal Chem*. 71:169–185.
- Grande-Martínez Á, Arrebola-Liébanas FJ, Martínez-Vidal JL, Hernández-Torres ME, Garrido-Frenich A. 2016. Optimization and validation of a multiresidue pesticide method in rice and wheat flour by modified QuEChERS and GS-MS/MS. *Food Anal Methods*. 9:548–563.
- He Z, Wang Y, Wang L, Peng Y, Wang W, Liu X. 2017. Determination of 255 pesticides in edible vegetable oils using QuEChERS method and gas chromatography tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*. 409:1017–1030.
- Jiménez-López J, Llorent-Martínez EJ, Ortega-Barrales P, Ruiz-Medina A.

2014. Multi-commutated fluorometric optosensor for the determination of citrinin in rice and red yeast rice supplements. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 31:1744–1750.
- Karami-Mohajeri S, Abdollahi M. 2011. Toxic influence of organophosphate, carbamate, and organochlorine pesticides on cellular metabolism of lipids, proteins, and carbohydrates: a systematic review. *Hum Exp Toxicol.* 30:1119–1140.
- Koesukwiwat U, Lehotay SJ, Leepipatpiboon N. 2011. Fast, low-pressure gas chromatography triple quadrupole tandem mass spectrometry for analysis of 150 pesticide residues in fruits and vegetables. *J Chromatogr A.* 1218:7039–7050.
- Llorent-Martínez EJ, Delgado-Blanca I, Ruiz-Medina A, Ortega-Barrales P. 2013. Separation of a binary mixture of pesticides in fruits using a flow-through optosensor. *Talanta.* 115:462–467.
- Llorent-Martínez EJ, Fernández-de Córdova ML, Ortega-Barrales P, Ruiz-Medina A. 2015. Analysis of agroalimentary and environmental contaminants using flow-through chemical optosensors. *Appl Spectrosc Rev.* 50:527–556.
- Llorent-Martínez EJ, García-Reyes JF, Ortega-Barrales P, Molina-Díaz A. 2007. Multicommutated fluorescence based optosensor for the screening of bitertanol residues in banana samples. *Food Chem.* 102:676–682.
- Llorent-Martínez EJ, Ortega-Barrales P, Fernández-de Córdova ML, Ruiz-Medina A. 2011. Trends in flow-based analytical methods applied to pesticide detection: a review. *Anal Chim Acta.* 684:30–39.
- Melchert WR, Reis BF, Rocha FRP. 2012. Green chemistry and the

- evolution of flow analysis. A review *Anal Chim Acta*. 714:8–19.
- Mostafalou S, Abdollahi M. 2017. Pesticides: an update of human exposure and toxicity. *Arch Toxicol*. 91:549–599.
- Nakagawa Y, Moldbus P, Moore GA. 1992. Cytotoxicity of ortho-phenylphenol in isolated rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol*. 43:159–165.
- Oliveira SM, Oliveira HM, Segundo MA, Rangel AOSS, Lima JLFC, Cerdà V. 2012. Automated solid-phase spectrophotometric system for optosensing of bromate in drinking waters. *Anal Methods*. 4:1229–11236.
- Ortelli D, Edder P, Corvi C. 2005. Pesticide residues survey in citrus fruits. *Food Addit Contam*. 22:423–4128.
- Piccirilli GN, Escandar GM. 2010. Second-order advantage with excitation-emission fluorescence spectroscopy and a flow-through optosensing device. Simultaneous determination of thiabendazole and fuberidazole in the presence of uncalibrated interferences. *Analyst*. 135:1299–1308.
- Preeti S, Aksha S, Nakuleshwar JD, Nidhi S, Suresh JC. 2015. A review on toxicological effects of fungicides. *Res J Pharm Biol Chem*. 6:348–360.
- Robles-Molina J, Lara-Ortega FJ, Gilbert-Lopez B, García-Reyes JF, Molina-Diaz A. 2014. Multi-residue method for the determination of over 400 priority and emerging pollutants in water and wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 1350:30–43.
- Rocha FRP, Batista AD, Melchert WR, Zagatto EAG. 2018. Solid-phase extractions in flow analysis. *An Acad Bras Cienc*. 90:803–824.

- Ruiz-Medina A, Soler-Gallardo MI, Llorent-Martínez EJ. 2018. Enhanced quenching effect of neonicotinoid pesticides on time-resolved terbium luminescence in presence of surfactants. *Journal of Chemistry*. 2018. Article ID 5378736.
- Saito-Shida S, Nemoto S, Teshima R, Akiyama H. 2016. Quantitative analysis of pesticide residues in vegetables and fruits by liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Food Addit Contam Part A*. 33:119–127.
- Salinas-Castillo A, Fernández-Sánchez JF, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A. 2004. A facile flow-through phosphorimetric sensing device for simultaneous determination of naptalam and its metabolite 1-naphthylamine. *Anal Chim Acta*. 522:19–24.
- Stachniuk A, Fornal E. 2016. Liquid chromatography-mass spectrometry in the analysis of pesticide residues in food. *Food Anal Methods*. 9:1654–1665.

4.3. Un nuevo enfoque para la extracción líquido-líquido automatizada en un sistema de inyección secuencial



I. Delgado-Blanca, E.J. Llorent-Martínez, A. Ruiz-Medina P. Ortega-Barrales.

Publicado en *Analytical and Bioanalytical Chemistry* en Enero de 2015, volumen 407:2, páginas 521-528.

Resumen

En este trabajo se presenta la implementación de la LLE en un sistema SIA. El sistema consta de dos jeringas independientes y una válvula multiposición. El método desarrollado se aplicó al análisis de tiamina (vitamina B1), llevando a cabo además la derivatización del analito en el mismo sistema de flujo, consiguiendo así un alto grado de automatización. La determinación cuantitativa de tiamina en el extracto obtenido se llevó a cabo mediante la medida de la fluorescencia del derivado obtenido. La adecuación del método fue demostrada mediante el análisis de preparados farmacéuticos y suplementos

dietéticos. Los límites de detección y cuantificación obtenidos fueron de 9 y 30 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Los resultados obtenidos fueron validados mediante el análisis de las muestras mediante un método cromatográfico.

El método propuesto implementa con éxito la LLE en un sistema SIA sencillo, con una sola válvula multiposición (configuración típica de un equipo comercial), usando un vial eppendorf como medio de extracción y separación. El uso individual de las jeringas para la disolución portadora, de carácter acuoso, y para el extractante orgánico (isobutanol), permite evitar los problemas asociados a las diferentes afinidades de las fases acuosas y orgánicas por los tubos de teflón, como son la formación de burbujas indeseadas o el desplazamiento irregular de las fases en el interior de los tubos. Este sistema propuesto contribuye al progreso en la automatización y miniaturización de la LLE, y por tanto a la mejora del tratamiento de muestra, minimizando los costes y el impacto medioambiental al disminuir sustancialmente tanto los tiempos de operación como el consumo de disolventes orgánicos con respecto a los métodos clásicos manuales.

“A new approach for automated liquid-liquid extraction in a sequential injection manifold”

Abstract

A new approach for the implementation of liquid–liquid extraction in a sequential injection manifold is presented. The manifold consists of two syringe pumps and one multi-position valve. The use of a 30 % MeOH/H₂O (v/v) solution as the carrier, with isobutanol as the extractant, made it possible to avoid the problems associated with the different affinities of the organic and aqueous phases for Teflon tubing, and the formation of bubbles. The suitability of the proposed method was demonstrated by the determination of thiamine in pharmaceutical preparations and dietary supplements. Detection and quantification limits were estimated as 9 and 30 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively. The repeatability was lower than 3 % and the intermediate precision (3 d) was lower than 7 %. The sample throughput was 14 samples per h. The results were in agreement with a high-performance liquid chromatography-electrospray/mass spectrometry reference method.

Keywords

SIA, Automation, Thiamine, Sample treatment, Pharmaceutical análisis, Food supplement

Introduction

Despite the significant advances in analytical instrumentation in recent years, sample treatment still remains an important part of most analytical methods. In fact, one of the main interests of analytical chemistry is the improvement of sample treatment, following the current trends toward miniaturization, simplification, automation, economicity, and environmentally friendly alternatives [1]. Liquid–liquid extraction (LLE) is one of the most common sample treatments in analytical methods; it is used to increase selectivity and sensitivity. However, conventional manually handled LLE presents many limitations. It is time-consuming, tedious, and demands large amounts of chemicals and sample, resulting in increased cost and environmentally harmful methods [1, 2]. As a result, efforts have been made to eliminate the disadvantages of manual LLE, including the use of liquid-phase micro-extraction [1–4], and attempts to automate LLE by using flow systems.

The implementation of LLE in flow systems presents advantages, such as the reduced consumption of organic solvents and sample, less human operation, and higher sample throughput and reproducibility. The early classic liquid–liquid flow injection systems consisted of a phase segmenter (or confluence), an extraction coil, and a phase separator [5, 6]. However, different systems have been described in scientific literature [2], such as single extraction [7], multiple extractions [8], closed-loop systems [9], and systems without separation of phases [10, 11], among others.

Although most of the described procedures made use of flow injection analysis, other flow methodologies have been used. In this way, a sequential injection analysis (SIA) with lab-at-valve approach was described for on-line liquid–liquid micro-extraction [12]. The automation of dispersive liquid–liquid micro-extraction (DLLME) was also recently carried out by means of SIA [13] and multi-syringe flow injection analysis [14] manifolds, performing the separation of phases directly in a syringe. Finally, the use of a double-valve SIA system for on-line LLE was developed in the last few years [15–17], using two independent units (each one with an independent multi-position valve and syringe pump) to avoid the problems associated with the use of phases with different affinities to the walls of the Teflon tubing in the SIA system.

In this work, a new SIA configuration is proposed, using only one multi-position valve, thus avoiding the use of a second independent multi-position valve. In this way, a commercial SIA apparatus can be used. Thiamine (vitamin B1) was selected as a model analyte to demonstrate the suitability of the proposed SIA manifold for the development of on-line LLE. Different approaches of LLE have been described for the determination of thiamine in the last years: using FIA, without separation of phases, it was quantified in pharmaceuticals [11]; DLLME was also applied to the analysis of thiamine in pharmaceuticals and human urine [18], and in food [19]. However, these last two works did not carry out the LLE in a flow system. All the mentioned works used the thiochrome method (oxidation of thiamine with hexacyano ferrate(III) to form fluorescent thiochrome) [20].

The SIA manifold proposed consists of one multi-position valve and two syringe pumps: one of them for the organic extractant and the other for the carrier solution. This system was applied to the determination of thiamine in pharmaceutical preparations and dietary supplements. The results were compared with a liquid chromatography-electrospray/mass spectrometry method (HPLC-ESI-MS).

Experimental

Reagents and solutions

Unless stated otherwise, all solutions were prepared from analytical-reagent grade chemicals and deionized water degassed by ultrasonic bath before use.

The standard stock solution (1000 mg L⁻¹ thiamine hydrochloride) was prepared from thiamine hydrochloride (≥99 %; Sigma, Alcobendas, Spain). The solution was stable for at least 1 mo when kept away from light at 4 °C. Working solutions were prepared daily by dilutions with water.

Sodium hydroxide (NaOH; ≥98 %) and potassium hexacyano ferrate(III) (K[Fe(CN)₆]; ≥99 %) were obtained from Panreac (Barcelona, Spain). A solution of 1.0 mol L⁻¹ NaOH was used for pH adjustment. K[Fe(CN)₆] solutions were prepared just before use, their pH was adjusted with the NaOH solution, and they were protected from light with aluminium foil.

The chloroform ($\geq 99\%$), isobutanol ($\geq 99\%$), and methanol (MeOH, $\geq 99.8\%$) used for the LLE were obtained from Sigma. HPLC-grade MeOH ($> 99.9\%$), 5-aminosalicylic acid (5-ASA; $\geq 99\%$), heptafluorobutyric acid ($\geq 99.5\%$), and all the vitamins and salts used in the interference study were obtained from Sigma.

Apparatus and instruments

A FIALab-3500 automatic analyzer (FIALab Instruments, Inc., Bellevue, WA, USA) was used. The analyzer included two 5-mL syringe pumps, a holding coil, a peristaltic pump, and an eight-port multi-position valve, all the components being computer-controlled by FIALab 5.0 software. The analyzer was connected to a Cary-Eclipse Luminescence Spectrometer (Varian Inc., Mulgrave, Australia) for luminescence measurements. A 176.752-QS Hellma flow cell (25 μL inner volume and 1.5 mm light path length) was used. All manifold tubings were made of 0.75 mm i.d. PTFE, except the ones used for the aspiration of the isobutanol and the carrier solution, which were 1.5 mm i.d. A polypropylene 1.5 mL-volume Eppendorf vial was used for the separation of the organic and aqueous phases. The manifold is shown in Fig. 1.

A Milli-Q-Plus ultra-pure water system from Millipore (Milford, MA, USA) was used to obtain the HPLC-grade water used during all the experiments. A Sonorex Digital 10P (Bandelin Electronic, Berlin, Germany) ultrasonic bath and a pH-meter Crison GLP 21 (Crison Instruments, Barcelona, Spain) were also used.

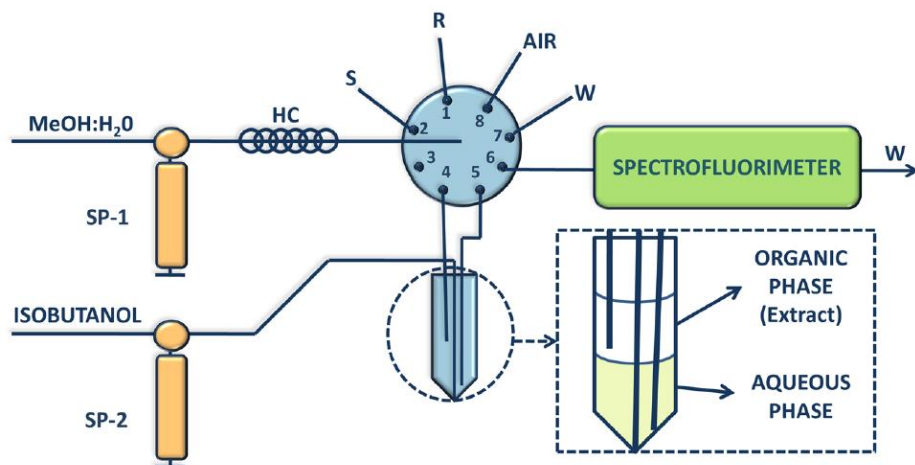


Figure 1. SIA manifold. R = reagent ($K[Fe(CN)_6]$ solution), S = sample, W = waste, SP = syringe pump; HC = holding coil. Isobutanol and MeOH:H₂O were used as extractant and carrier solution, respectively.

A high-performance liquid chromatography-ion trap-mass spectrometry (HPLC-ESI-IT-MS) method was used as reference method. The HPLC system (Agilent Series 1100; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) was equipped with a reversed phase ODS2 C₁₈ analytical column of 125 mm× 3 mm and 5 μ m particle size (Waters, Cerdanyola del Vallès, Barcelona, Spain). Column temperature was maintained at 30 °C. The chromatographic conditions were adapted from [21]. The samples were filtered through 0.45 μ m PTFE membrane filters, and 2 μ L were injected, using 5-ASA as internal standard.

Mobile phases A and B consisted of 5 mM heptafluorobutyric acid (prepared in H₂O), and 100 % MeOH, respectively. The following HPLC program was used: 95 % A (0–4 min), 85 % A (11 min), 70 % A (15 min), 0 % A (20–25 min). The flow-rate was 0.4 mL min⁻¹. The HPLC system was connected to an ion-trap mass spectrometer (Esquire 6000; Bruker

Daltonics, Billerica, MA, USA) equipped with an electrospray interface operating in positive ion and full scan (50–1000) modes. The integrated peak area related to the protonated molecule of thiamine ($[M+H]^+$, m/z 265) was used to construct the analytical curve.

Sample treatment

The pharmaceutical formulations were purchased from a local pharmacy, in the forms of tablets and injectable vials. Dietary supplements, in the form of tablets, were bought from the internet. For tablets, three of each formulation were accurately weighed and finely ground. A portion of the powder was transferred to a 100 mL volumetric flask and dissolved in water. After sonication, the solution was filtered, if required, using a cellulose acetate filter [0.45 μm pore size, Millipore (Bedford, MA, USA)]. For the injectable vials, no pretreatment was required. In all cases, the pH of the sample solution was measured and, if its value was below 6, the pH was increased to a value between 6 and 13 with the aid of a 1.0 mol L⁻¹ NaOH solution. Suitable dilutions were made with water before measurement.

General procedure

The sequence of steps for the extraction and determination of thiamine are presented in Table 1. They consisted of the following:

- (a) First, 100 μL of carrier solution (30 % MeOH:H₂O, v:v) was aspirated into SP-1, and 300 μL of sample solution was aspirated into SP-1, and 300 μL of sample solution was aspirated by SP-1 into the holding

coil. They were pumped towards the waste, thereby avoiding contamination with the previous sample (steps 1–3).

- (b) Aliquots of $\text{K}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ and sample solutions (total volume of 250 μL of each solution) were aspirated and pumped towards the Eppendorf vial using SP-1 (steps 4–9).
- (c) Using SP-2, 500 μL of the extractant (isobutanol) was added to the Eppendorf vial and 1000 μL of air were bubbled into the Eppendorf vial by SP-1 to improve the mixing of solutions (steps 10–14).
- (d) After a 60-s delay time to separate the phases, 350 μL of the organic phase (upper part) was aspirated by SP-1 and pumped toward the flow-cell using 3000 μL of the carrier solution (steps 15–18).
- (e) Finally, the remaining solution in the Eppendorf vial was aspirated and emptied into the waste (steps 19–21), and the Eppendorf vial was cleaned twice with 1000 μL of the carrier (steps 22–25, twice).

Table 1. Sequence of steps for the extraction procedure and B1 determination

Step	Port selection	Flow rate ($\mu\text{L s}^{-1}$)	Operation	Description
1	-	100	Aspirate 100	Aspirate carrier with SP-1
2	2	100	Aspirate 300	Aspirate standard or sample solution
3	7	100	Empty	Empty SP-1 into waste
4	-	100	Aspirate 50	Aspirate carrier with SP-1
5	1	100	Aspirate 125	Aspirate $\text{K}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ solution
6	2	100	Aspirate 125	Aspirate standard or sample solution
7	1	100	Aspirate 125	Aspirate $\text{K}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ solution
8	2	100	Aspirate 125	Aspirate standard or sample solution
9	5	100	Empty	Empty SP-1 into the Eppendorf vial
10	-	100	Aspirate 500	Aspirate isobutanol with SP-2
11	-	30	Empty	Empty SP-2 into the Eppendorf vial
12	-	100	Aspirate 50	Aspirate carrier with SP-1
13	8	100	Aspirate 1000	Aspirate air
14	5	100	Empty	Empty SP-1 into the Eppendorf vial
15	-	-	Delay 60 s	Delay to improve separation of phases
16	-	100	Aspirate 3000	Aspirate carrier with SP-1
17	4	20	Aspirate 350	Aspirate the separated organic phase
18	6	50	Empty	Empty SP-1 into the flow cell in the detector
19	-	100	Aspirate 100	Aspirate carrier with SP-1
20	5	100	Aspirate 800	Aspirate from the bottom of the Eppendorf vial
21	7	100	Empty	Empty SP-1 into the waste
22	-	100	Aspirate 1000	Aspirate carrier with SP-1
23	4	100	Empty	Empty SP-1 into the Eppendorf vial
24	5	100	Aspirate 1000	Aspirate from the bottom of the Eppendorf vial
25	7	100	Empty	Empty SP-1 into the waste

SP = syringe pump

Results and discusión

SIA configuration and selection of the organic extractant

First, the selection of the SIA configuration and the extractant (chloroform or isobutanol) was carried out. The flow profiles obtained with each SIA configuration are shown in Fig. 2. Only one syringe pump was used for configurations 2a and 2b, whereas two syringe pumps were used in configurations 2c and 2d.

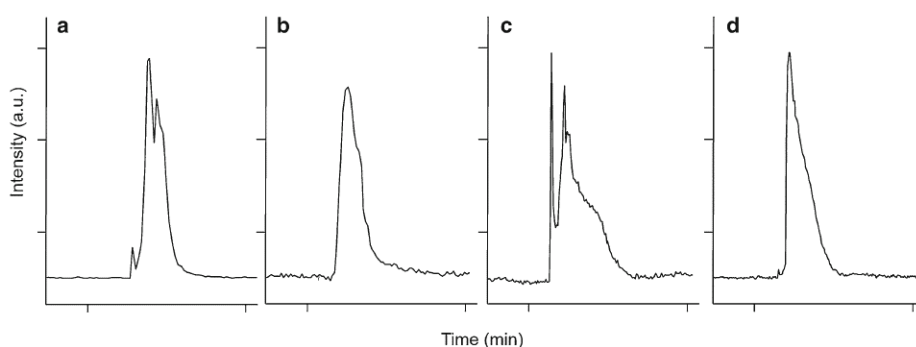


Figure 2. Analytical signals recorded with the different SIA configurations tested: **a** one syringe pump (H₂O as the carrier), and extractant (chloroform) introduced through one port of the multi-position valve; **b** one syringe pump (chloroform as the extractant and the carrier); **c** two syringe pumps (MeOH:H₂O as the carrier, and chloroform as the extractant); **d** two syringe pumps (carrier MeOH:H₂O, and isobutanol as the extractant); a.u. stands for arbitrary units. Study performed with 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ thiamine standard solution, and $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ hexacyano ferrate(III) solution.

In the first approach, the organic extractant was introduced through one of the multi-position valve ports, using water as carrier in the syringe pump. This configuration led to problems because of the different densities and affinities of the aqueous and organic phases for the Teflon tubings. The organic phase entered the reactor, sometimes

even the syringe pump; the organic solution underwent displacements in the tubing even with the system in stand-by; bubbles appeared, deteriorating precision in the analytical signal; and a double-peak was obtained (Fig. 2a). These problems have been previously mentioned [17]. To solve them, one option was to use the organic extractant directly as carrier instead of water, so only the organic phase entered the reactor and the detector, and not the aqueous phase. Although the flow profile was good (Fig. 2b), the handicaps were a decrease in the analytical signal because of the dilution caused by the organic carrier, and an excessive consumption of the organic solvent.

A second syringe pump was then used for the organic extractant, and a mixture of MeOH and water was used as the carrier solution. In this way, the extractant and the aqueous solutions [sample and hexacyano ferrate(III)] went through different tubings, and the problems observed in the previous configurations were avoided. Two organic extractants were tested: chloroform and isobutanol. With chloroform, formation of bubbles and some turbidity were observed in the flow-cell, producing irregular traces with multiple peaks (Fig. 2c), whereas these problems did not occur using isobutanol as the extractant (Fig. 2d), observing well-defined and reproducible peaks. The best results observed with isobutanol were attributable to its partial solubility with the MeOH:H₂O carrier solution, thereby avoiding the problem of bubbles formation at the interface carrier-extract. In addition, higher sensitivity (30 %–40 %) was obtained using isobutanol as the organic solvent. Hence, isobutanol was selected as the extractant for further experiments.

The percentage of MeOH in the carrier solution was also optimized, paying attention to the sensitivity and the precision of the system. On one hand, the sensitivity worsened as the percentage of MeOH was increased (due to the solubility of the sample solution in the carrier solution). On the other hand, the precision improved as the percentage of MeOH was increased. As a compromise solution, a 30 % MeOH:H₂O (v:v) solution was selected as the carrier for further experiments.

To sum up, the following configuration was selected for the optimization of the rest of the parameters: two syringe pumps and one multi-position valve; isobutanol (inserted by one of the syringe pumps) as the extractant; and a MeOH:H₂O (30:70, v:v) solution as the carrier, inserted by the other syringe pump. It is important to highlight that this configuration made it possible to use only one multi-position valve, so commercial SIA instruments can be used without the necessity to incorporate an external multi-position valve to avoid the mixing of aqueous and organic phases.

Fluorescence spectra and instrumental parameters

The emission and excitation spectra of thiochrome were recorded in isobutanol, observing maximum fluorescence intensity at $\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 372/430$ nm/nm, so these wavelengths were selected for further experiments. The influence of the voltage of the photomultiplier tube (400–900 V) and the instrument excitation and emission slit widths (5–20 nm) were studied, selecting as values 820 V and 10/20 nm/nm for the voltage and the excitation/emission slit widths, respectively. In this way, high sensitivity and low background signals were obtained.

Chemical and flow parameters

All the following experiments were carried out using a $500 \mu\text{g L}^{-1}$ thiamine standard solution and with the SIA configuration previously described.

The oxidation of thiamine by $\text{K}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ to form fluorescent thiochrome takes place under alkaline conditions. Hence, the pH of the hexacyano ferrate(III) solution was first optimized; this study was performed in the range of pH values between 10 and 13. The analytical signal increased up to a pH value of 12.5 and then remained constant, so the $\text{K}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ solution was prepared in a 0.1 mol L^{-1} NaOH medium. Then, the influence of hexacyano ferrate(III) concentration was studied in the 10^{-4} to $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ range. In this case, the analytical signal increased up to a concentration of $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ and then constantly diminished because of the higher rate of thiochrome decomposition [11]. Hence, a $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ hexacyano ferrate(III) solution in 0.1 mol L^{-1} NaOH was selected for further experiments.

The pH of the sample solution was also optimized, observing constant analytical signals for pH values between 6 and 13. As a result, the pH of sample solutions was always measured and adjusted to pH values higher than 6 when necessary.

Different experiments were carried out to optimize the on-line reaction between thiamine and hexacyano ferrate(III). In this sense, the sequence of aspiration of sample and $\text{K}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ solutions was studied. Using a total volume of $250 \mu\text{L}$ sample (S) + $250 \mu\text{L}$ reagent (R), the following sequences were tested: (a) S+R; (b) R+S; (c) R+S+R; (d)

R+S+R+S. The analytical signals obtained were lower using options **a** and **b**, whereas signal increases of 25 % and 50 % were observed for options **c** and **d**, respectively. Hence, the sequence **d** was selected due to a higher mixing between sample and $K[Fe(CN)_6]$ solutions.

The volume of the extractant was selected by varying the volumes of isobutanol between 400 and 600 μL . Taking into account that the total volume of the aqueous phase (S+R) was 500 μL , the volumes studied of the extractant corresponded to ratios between 0.8:1 and 1.2:1 for organic:aqueous phases (v:v). Extractant volumes lower than 400 μL were insufficient for the aspiration of the organic phase after the separation in the Eppendorf vial, whereas volumes higher than 600 μL were excessive for the Eppendorf vial size. The analytical signal was approximately constant for all the volumes of isobutanol tested, although a slight decrease was observed for 600 μL of isobutanol. Finally, a volume of 500 μL of isobutanol was selected, as a better precision was observed than for the lower volumes, which caused some problems during the separation of the phases, and during the aspiration of the organic phase in the LLE separation unit.

The flow rate of the solutions was optimized too. For the aspiration of solutions from their corresponding vessels, a flow-rate of 100 $\mu\text{L s}^{-1}$ was always used to improve the sample throughput. However, different flow-rates were used for the LLE procedure. For didactic purposes, the LLE procedure could be separated into the following steps:

- (1) Introduction of sample and reagent into the Eppendorf vial: this step was performed at a flow-rate of 100 $\mu\text{L s}^{-1}$.

- (2) Introduction of isobutanol into the Eppendorf vial: this was one of the most critical steps. First of all, considering the lower density of isobutanol, it was introduced through the bottom of the Eppendorf vial. In this way, the mixing of aqueous and organic solutions was improved. In addition, the flow-rate for the insertion of isobutanol was optimized ($20\text{--}100\ \mu\text{L s}^{-1}$), observing that the signal was maximum at $30\ \mu\text{L s}^{-1}$ and then constantly decreased (Fig. 3).
- (3) Pumping of air into the Eppendorf vial: the bubbling of air into the Eppendorf vial increased the extraction yield. The volume and flow-rate of the air were optimized, observing that $1000\ \mu\text{L}$ of air was sufficient when using a flow-rate of $100\ \mu\text{L s}^{-1}$.
- (4) Separation of phases: the precision of the procedure was increased if the organic phase (containing thiochrome) was not immediately aspirated. Therefore, a delay time of $60\ \text{s}$ was included in the SIA procedure.
- (5) Aspiration of the organic phase: the analytical signal was also dependent on the aspiration flow-rate. A flow-rate of $20\ \mu\text{L s}^{-1}$ was selected for the aspiration of $350\ \mu\text{L}$ of the organic phase.
- (6) A flow-rate of $50\ \mu\text{L s}^{-1}$ was used to pump isobutanol (with the aid of the carrier) to the spectrofluorimeter, recording the analytical signal of thiochrome. Higher flow-rates slightly decreased the repeatability of the system.

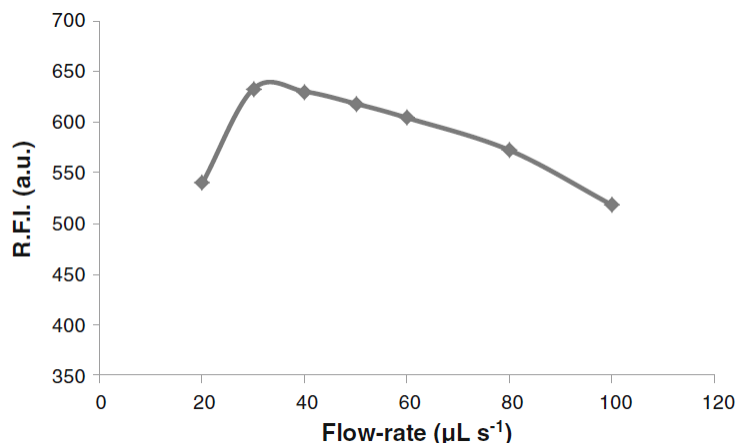


Figure 3. Effect of the flow-rate of isobutanol extractant in the analytical signal; R.F.I. (a.u.) = relative fluorescence intensity (arbitrary units). Study performed with $400 \mu\text{g L}^{-1}$ thiamine standard solution, and $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ hexacyano ferrate(III) solution.

Finally, to improve extraction efficiency in LLE, the salting-out effect might be used. In this case, the addition of sodium chloride was tested, in the range of concentrations of 1×10^{-4} to 1.0 mol L^{-1} . No improvement was observed in the analytical signal, so the use of sodium chloride was not necessary.

Under the optimized conditions previously discussed, a sample throughput of 14 samples per h was obtained. In addition, volumes of 0.25, 0.25, and 0.5 mL of sample solution, $\text{K}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ solution, and isobutanol, respectively, are used in this SIA method, whereas in a classic LLE method [20], volumes of 5, 3, and 15 mL of sample solution, $\text{K}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ solution, and isobutanol, respectively, are usually needed. This means that savings higher than 90 % in sample and reagents are achieved using the SIA procedure here proposed.

Method validation

After the optimization of the on-line LLE, the proposed method was validated. Following are the different parameters that were studied.

Selectivity

The study of the selectivity was performed by observing the analytical signal obtained for thiamine ($300 \mu\text{g L}^{-1}$) with and without the presence of potentially interfering compounds. In this sense, a tolerance study was carried out for those compounds that are usually found along with thiamine in pharmaceuticals and dietary supplements, including other vitamins from the B-complex group. Potentially interfering compounds were added to the standard thiamine solution at concentrations higher than those usually found in the analyzed products. Tolerance level was defined as the amount of foreign species that produced an error not exceeding $\pm 2\sigma$ in the determination of the analyte, being σ the standard deviation. The results are shown in Table 2.

The tolerance to potentially interfering compounds was observed to be much higher than the amount usually found in the analyzed products, thereby allowing the accurate determination of thiamine in the presence of these compounds.

Table 2. Interference study

Foreign species	Tolerated interferent/analyte (w/w) ratio ^a
Starch ^b , Ca ²⁺ , Mg ²⁺	>1000 ^c
Zn ²⁺	100
Ascorbic acid	40
Niacin	30
Panhotenic acid	15
Cu ²⁺	10
Pyridoxine, riboflavin	5
Cyanocobalamin	4
Biotin, folic acid, retinol, vitamin E	1

^aFor a 300 $\mu\text{g L}^{-1}$ thiamine concentration

^bExcipient

^cMaximum ratio tested

Linearity, limit of detection (LOD), and limit of quantification (LOQ)

The linearity of the analytical curve was assessed by using eight aqueous standard solutions in the concentration range of 30–1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ thiamine. Using the peak height as the analytical signal, the data were fitted by standard least squares treatment. A typical equation for the analytical curve was $\text{R.F.I.} = -9.3843 + 0.7329C$, C being the concentration of thiamine expressed in $\mu\text{g L}^{-1}$ and R.F.I. the relative fluorescence intensity. The correlation coefficient was 0.9991, which was considered to be satisfactory for establishing the linearity and working range of the proposed method as 30–1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ thiamine.

The LOD and limit of quantitation LOQ for thiamine were determined by the signal to noise (S/N) ratio method. They were

estimated as the concentration of thiamine that provided S/N ratios of 3:1 and 10:1, respectively. LOD and LOQ of 9 and 30 $\mu\text{g L}^{-1}$ thiamine were obtained.

Precision

The repeatability and the intermediate precision of the proposed method were studied using the pharmaceutical sample Benerva, diluted to obtain a concentration of 250 $\mu\text{g L}^{-1}$ thiamine. The repeatability was calculated by the analysis of 10 independent sample solutions, during a period of 5 h, under the same conditions. For the intermediate precision, the solution was analyzed for 3 d consecutively under the same experimental conditions. Relative standard deviation (RSD) values of 2.3 % and 6.5 % were obtained for repeatability and intermediate precision, respectively.

Accuracy

The study of the accuracy was carried out by analyzing pharmaceuticals available in local pharmacies, and dietary supplements, and comparing the obtained results with an HPLC-ESI/MS reference method.

Five products were analyzed: one of them contained only thiamine (Benerva); another one consisted of a mixture of vitamins of the B group (Hidroxil); two were supplements containing minerals and vitamins (Berocca Boost and Micebrina); and the last one was a supplement containing minerals, vitamins, polyphenols, and amino acids (Greens

natural nutrients). The samples were prepared as described under the sample preparation section and were analyzed in triplicate. The results of the proposed method were compared with those obtained with the reference method by means of a t-test and F-criterion at a 5 % significance level. The results obtained are shown in Table 3, observing no significant differences between both methods. Therefore, the accuracy of the method was demonstrated for the intended applications.

Table 3. Analytical applications

Product	Thiamine HCl found \pm SD ^a			
	Proposed method	Reference method	t ^b	F ^c
Benerva ^d	98 \pm 3	100 \pm 3	0.81	1.00
Berocca Boost ^e	1.40 \pm 0.03	1.41 \pm 0.04	0.35	1.78
Greens natural nutrients ^f	8.7 \pm 0.8	8.9 \pm 0.7	0.33	1.31
Hidroxil ^g	256 \pm 9	254 \pm 8	0.29	1.26
Micebrina ^h	1.43 \pm 0.04	1.41 \pm 0.05	0.27	1.56

^aExpressed in mg per tablet or mg per mL; n=3

^bTheoretical value for p=0.05, t=2.78

^cTheoretical value for p=0.05, F=39.00

^dInjectable vials; 100 mg mL⁻¹ thiamine

^eEffervescent tablets; 1,4 mg thiamine per tablet

^fCoated tablets; 8.3 mg thiamine per tablet

^gCoated tablets; 250 mg thiamine per tablet

^hCoated tablets; 1,4 mg thiamine per Tablet

Robustness

The robustness of an analytical procedure measures its

susceptibility against small but deliberate variations in specific experimental conditions. In this case, small changes were made to the carrier solution (45%–55% MeOH:H₂O, v:v), flow-rates ($\pm 2 \mu\text{Ls}^{-1}$), and excitation/emission fluorescence wavelengths ($\pm 2 \text{ nm}$). This study was performed with a standard solution containing $300 \mu\text{g L}^{-1}$ thiamine. Fluctuations lower than $\pm 5 \%$ (RSD) were observed in the analytical signals compared with those obtained under the optimized conditions, thereby demonstrating the robustness of the proposed method.

Conclusions

A new approach to perform automated LLE is here proposed, using a commercial SIA system (only one multi-position valve is required) and a 1.5 mL polypropylene Eppendorf vial as the separation unit. The organic extractant was introduced through one of the syringe pumps, avoiding its contact with the tubings through which the aqueous sample and reagents were inserted. In this way, the problems of bubbles formation and liquid displacements attributable to the differences between the organic and aqueous phases were avoided. A mixture of MeOH:H₂O was used as the carrier and as a cleaning solution, avoiding cross-sample contamination in the Eppendorf vial. This new approach could be useful for further progress in LLE automation, providing improvements in sample treatments.

Acknowledgments

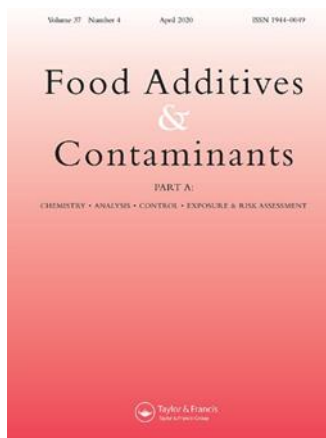
The authors gratefully acknowledge the University of Jaén, Project UJA 2011/12/31, for financial support.

References

1. Yan H, Wang J (2013) *J Chromatogr A* 1295:1–15
2. Silvestre CIC, Santos JLM, Lima JLFC, Zagatto EAG (2009) *Anal Chim Acta* 652:54–65
3. Anthemidis AN, Mitani C (2013) *Curr Anal Chem* 9:250–278
4. Yang C, Wang J, Li D (2013) *Anal Chim Acta* 799:8–22
5. Bergamin FH, Medeiros JX, Reis BF, Zagatto EAG (1978) *Anal Chim Acta* 101:9–16
6. Karlberg B, Thelander S (1978) *Anal Chim Acta* 98:1–7
7. Kubáň V (1991) *Crit Rev Anal Chem* 22:477–557
8. Wang J, Hansen EH (2000) *Anal Lett* 33:2747–2766
9. Atallah RH, Christian GD, Hartenstein SD (1988) *Analyst* 113:463–469
10. Kina K, Shiraishi K, Ishibashi N (1978) *Talanta* 25:295–297
11. Alonso A, Almendral MJ, Porras MJ, Curto Y (2006) *J Pharm Biomed Anal* 42:171–177
12. Burakham R, Lapanantnoppakhun S, Jakmunee J, Grudpan K (2005) *Talanta* 68:416–421
13. Suárez R, Horstkotte B, Duarte CM, Cerdà V (2012) *Anal Chem* 84:9462–9469
14. Maya F, Horstkotte B, Estela JM, Cerdà V (2012) *Anal Bioanal Chem* 404:909–917
15. Škrliková J, Andruch V, Sklenářová H, Chocholouš P, Solich P, Balogh IS (2010) *Anal Methods* 2:1134–1139
16. Acebal CC, Sklenářová H, Škrliková J, Šrámková I, Andruch V, Balogh IS, Solich P (2012) *Talanta* 96:107–112

17. Škrliková J, Andruch V, Sklenářová H, Chocholouš P, Solich P, Balogh IS (2010) *Anal Chim Acta* 666:55–61
18. Zeeb M, Ganjali MR, Norouzi P (2010) *Microchim Acta* 168:317–324
19. Viñas P, López-García I, Bravo-Bravo M, Briceño M, Hernández-Córdoba M (2012) *Anal Bioanal Chem* 403:1059– 1066
20. Welcher FJ (1975) *Standard methods of chemical analysis*, 6th edn. New York, Krieger
21. Chen Z, Chen B, Yao S (2006) *Anal Chim Acta* 569:169–175

4.4. Extracción líquido-líquido automatizada en un sistema de inyección en flujo multijeringa para estudios de migración en materiales de contacto alimentario: análisis de 4,4'-dihidroxibifenilo



I. Delgado-Blanca, E.J. Llorent-Martínez, A. Ruiz-Medina P. Ortega-Barrales.

Publicado en *Food Additives and Contaminants: Part A* en enero de 2020, volumen 37:1, páginas 174-182.

Resumen

En este trabajo se desarrolló un método para la LLE automatizada en muestras de carácter oleoso. En concreto, el método se aplicó a la extracción de 4,4'-dihidroxibifenilo en aceite de oliva rectificado (simulante alimentario empleado en los ensayos de migración de materiales plásticos destinados al contacto con alimentos grasos). Se propone para ello el uso de un sistema MSFIA provisto de 4 jeringas, una válvula multiposición y una válvula de selección, que

permite la completa automatización del procedimiento de LLE. Tras la extracción, la detección del analito se lleva a cabo a través de un optosensor en flujo continuo, empleando una pequeña cantidad de gel de sílice enlazada con C₁₈ como soporte sólido en el interior de la célula de flujo, donde el analito es preconcentrado y su señal de fluorescencia nativa es registrada. De este modo se mejora la sensibilidad del sistema, obteniendo límites de detección y cuantificación de 0.05 y 0.16 mg kg⁻¹, respectivamente. Estos valores son adecuados para los requerimientos de Europa, donde se establece un límite de migración específica (SML) de 6 mg kg⁻¹. Para la validación del método, se analizaron muestras procedentes de ensayos de migración de diversos materiales plásticos, y se llevaron a cabo estudios de recuperación en las mismas. Estas muestras fueron analizadas mediante el método propuesto y el método normalizado CEN empleado en los laboratorios de rutina (LLE manual y determinación cromatográfica), no encontrándose diferencias estadísticas entre ambos métodos.

El método desarrollado constituye un avance para la automatización de la LLE, siendo la primera vez que se reporta la extracción online de muestras de carácter oleoso. Si lo comparamos con el método normalizado, el método propuesto consigue una reducción drástica del consumo de disolventes orgánicos, así como un incremento de la frecuencia de muestreo de 1 a 7. Este método presenta un gran potencial para el análisis de otros analitos, pues el extractante puede ser optimizado en función del compuesto a analizar. Además, esta LLE *online* puede ser acoplada con técnicas cromatográficas, lo que permitiría el análisis multirresiduo. Por ello, esta estrategia desarrollada

puede ser implementada como una alternativa a los métodos normalizados, minimizando el consumo de reactivos y disolventes, así como los tiempos de operación, aspectos muy importantes en laboratorios de rutina que realizan este tipo de analíticas.

“Automated on-line liquid-liquid extraction in a multisyringe flow injection análisis manifold for migration studies in food-contact materials: analysis of 4,4′-dihydroxybiphenyl”

Abstract

Packaging may represent a source of food contamination, as different organic compounds and degradation compounds may migrate from packaging to foodstuff. For fatty foods, rectified olive oil is the common simulant, which implies time-consuming and laborious liquid-liquid extraction (LLE) procedures to isolate the contaminant(s) from the oil. Here we propose a Multisyringe Flow Injection Analysis manifold to automate this sample treatment, using the monomer 4,4′-dihydroxybiphenyl as the contaminant. The LLE procedure, using water as extractant, was fully automated. After the on-line LLE, the resulting extract was pumped through a fluorescence detector, inside which a flow-cell filled with C₁₈ silica gel solid support was placed. The analyte was pre-concentrated on the solid support (in which the analytical signal was directly recorded), so improving the sensitivity of the system. Under optimum conditions, the method detection limit is 0.05 mg kg⁻¹, well within the specific migration limit of 6 mg kg⁻¹. The method developed was compared with the standard CEN test method (off-line LLE and HPLC determination) observing savings in sample and reagents of 90% and a 7-fold increase in sample throughput.

Keywords

Olive oil; food contact; migration; polymer; multisyringe flow injection

analysis; liquid-liquid extraction.

Introduction

Packaging is a fundamental aspect in food manufacturing processes, providing food safety in terms of protection from microorganisms, biological and chemical changes. However, due to the different materials and additives used in packaging, migration from packaging to foodstuff can take place and concerns about safety have been present in the last decades (Lau and Wong 2000; Arvanitoyannis and Kotsanopoulos 2013). The most likely migrants are organic compounds such as plasticisers, lubricants, antioxidants and other additives, as well as monomers or degradation compounds generated during manufacturing processes. Some of these compounds are endocrine disruptors, carcinogenic, mutagenic, or allergenic compounds (Bang et al. 2012; Kumar 2018; Groh et al. 2019).

It became thus mandatory to develop regulations to ensure food safety concerning food-contact materials. Specifically, the European Commission published Regulation 10/2011 to establish the specific rules for plastic materials and articles intended to come into contact with foodstuffs, as well as migration limits and standard conditions of analysis in migration tests (European Union 2011). For these tests, different substitutes of real food are used to obtain comparable and standardised results: aqueous solutions for most foods and rectified olive oil for fatty foods. To perform the tests, food-contact plastics are exposed to the simulants under controlled conditions (European Committee for Standardization 2004; European Union 2011);

afterwards, the potential migrant compounds are usually analysed by chromatography (Lau and Wong 2000; Sanchis et al. 2017). Aqueous simulants are directly injected into the chromatographic system. However, oil is subjected to a suitable sample treatment, usually liquid-liquid extraction (LLE) (Nerin et al. 2012). Therefore, common migration tests – due to the requirement of manual LLE – are highly time-consuming, laborious, and demand high volumes of organic solvents per sample analysed. In these regards, the automation of sample treatment is a research field of high importance, in accordance with the principles of Green Chemistry.

Green Chemistry involves the design of chemical products and processes to reduce or eliminate the use and generation of hazardous substances (Anastas and Eghbali 2010). In line with this principle, flow automated methods have also evolved to fulfil the new requirements. As mentioned above, one of the main handicaps of conventional LLE in migration tests is the high consumption of organic solvents (Spietelun et al. 2014). To avoid this, different researchers have automated and miniaturised this sample treatment (Silvestre et al. 2009; Alexovič et al. 2017). Different flow methodologies have been employed, such as Sequential Injection Analysis (Škrliková et al. 2010; Nerin et al. 2012), Flow Injection Analysis (Martinis et al. 2011) and Lab-In-Syringe (Horstkotte et al. 2017; Wang et al. 2018). These methodologies have been applied to the extraction of organic analytes in aqueous matrices, but none of them to the extraction of fatty or oily samples to our best knowledge. Multisyringe Flow Injection Analysis (MSFIA), which entails the use of a multisyringe burette with three-way solenoid valves at the

head of each burette to handle the direction of movement of the solutions (Miró et al. 2002), presents outstanding advantages of robustness, versatility, and precision. Hence, we selected this methodology for the automation of LLE applied to the analysis of fatty simulants coming from food contact materials migration tests.

This work aimed to develop an automated MSFIA method that avoids the handicaps of the current standard tests. The most important aspects were the automation of LLE to handle all the required steps without human intervention and the miniaturisation of sample treatment to minimise sample and reagents volumes. The detection was carried out by means of a flow-through fluorescence optosensor (Llorent-Martínez et al. 2011) (the analyte is retained on a solid support placed in the flow-cell, recording its luminescence signal), which provides the sensitivity required (due to the on-line preconcentration of the analyte on the solid support), reducing the time of analysis required by manual LLE and HPLC in the usual migration studies. The suitability of the method developed was demonstrated for a standard monomer: 4,4'-dihydroxybiphenyl.

4,4'-Dihydroxybiphenyl (4,4'-biphenol, 4,4'- biphenyldiol, or 4,4'-diphenol; DHBP; CAS 92-88-6) is an intermediate monomer used in the manufacture of thermoplastics such as liquid crystalline polymers, polyesters, polycarbonates, and polysulfones (Asrar et al. 1983; Kricheldop et al. 1997; Eckardt et al. 2018). DHBP is also employed as an antioxidant additive (ageing inhibitor) in other polymeric materials Humme 2002). Therefore, it may be present in a wide variety of food-contact materials, such as polycarbonate or polysulphones bottles,

polyester or polyolefin films, or coating resins of cans. Several studies have reported its oestrogenic and antiandrogen activity (Nishihara et al. 2000; Olsen et al. 2003). Hence, we selected this compound as a model analyte for the method here reported, which was applied to migration tests in rectified olive oil for different plastics, and the results were critically compared with the CEN method of analysis (European Committee for Standardization 2005).

Materials and methods

Reagents and solutions

DHBP was purchased from Sigma-Aldrich (Alcobendas, Madrid, Spain). Stock solutions were prepared in methanol and were stable for at least one month when stored protected from light at 4°C. Working solutions were prepared daily by dilution with MilliQ water.

Acetonitrile, heptane, hexane, and methanol were bought from Sigma. All solvents were HPLC grade. Ultrapure water (Milli-Q Waters purification system; Millipore; Milford, MA, USA) was used in all experiments. The solid support (C₁₈ beads, 55–105 µm particle size) was obtained from Waters (Milford, USA). All analytes involved in the interference study were obtained from Sigma.

Fatty food simulant (Simulant D2, refined olive oil according to 10/2011 Regulation) was provided by Gustav Heess (Barcelona, Spain).

Apparatus and instruments

An automatic MSFIA analyser was used. The system was composed of a multiburette module (Multiburette 4S, Crison, Spain) equipped with four 5 mL syringes (Hamilton, Switzerland) and a module equipped with an 8-way multiposition valve (V1) and a classic rotary valve (V2) (VA 2.0, Crison, Spain). An extra three-way solenoid valve (Takasago Electric Inc, Nagoya, Japan) was connected to the multisyringe system by means of a protection system (Sciware, Palma de Mallorca, Spain). The MSFIA analyser was controlled by computer with Autoanalysis 5.0 software (Sciware, Palma de Mallorca, Spain).

The MSFIA analyser was connected to a Cary-Eclipse Fluorescence Spectrophotometer (Varian Inc., Mulgrave, Australia) for luminescence measurements. A 176.752-QS Hellma flow cell (25 μ L inner volume and 1.5 mm light path length) was filled with the C₁₈ solid support. Tubing was made of 0.75 mm i.d. polytetrafluoroethylene (inert material for the solvents used in the system). A conic glass vial of 2.5 mL was used for the separation of the organic and aqueous phases. The manifold is shown in Figure 1.

A Sonorex Digital 10P (Bandelin Electronic, Berlin, Germany) ultrasonic bath and a pH-metre Crison GLP 21 (Crison Instruments, Barcelona, Spain) were also used.

The standard CEN method was used as reference method. Analyses were performed with an HPLC system (Shimadzu Prominence 20 series, Shimadzu, Duisburg, F.R. Germany) equipped with a diode array detector (PD-M20A, Shimadzu, Duisburg, F. R. Germany), using a

reversed-phase C₁₈ column (200 x 4.6 mm, 5 μm particle size, Hypersil ODS, Sharlau Science, Barcelona, Spain) maintained at 25°C. The chromatographic conditions are described in the European Standard (European Committee for Standardization 2005).

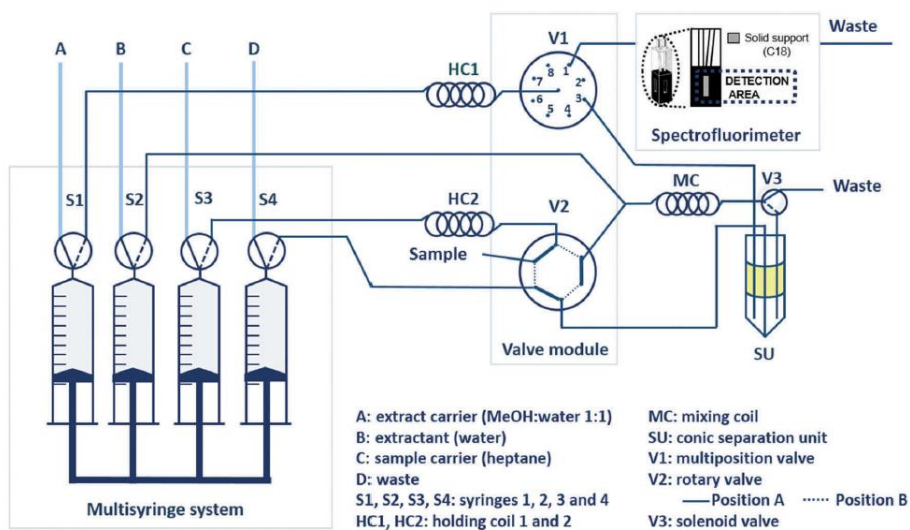


Figure 1. MSFIA manifold.

Migration test

Plastic samples were provided by Andaltec Foundation (Jaén, Spain). Two polyethylene terephthalate (PET) sheets and two polyethylene (PE) films, all of them single-use materials, and two polycarbonate dishes (repeated-use materials) were analysed as examples of common food contact materials. Each sample was treated according to the official migration test conditions (European Committee for Standardization 2004) using Food simulant D2. The plastic is put in contact with the food simulant in a manner that represents the worst foreseeable conditions of use (time and temperature conditions

according to the Regulation).

The procedure (total immersion) was as follows: test specimens of 1 dm² were cut and immersed in 100 mL of food simulant. The samples were kept in the simulant for 10 days at 40°C. Then, the simulant was analysed following the procedure reported in the following section (*General procedure*).

General procedure

Previously to the analysis in the multisyringe unit (MS), the oil was diluted with heptane in a ratio 1:1 (v:v). The procedure – which is completely described in Table 1- was as follows:

- a. **Sample tube cleaning.** With the rotary valve (V2) in position “B”, 500 µL of sample solution are aspirated by syringe S4 and pumped towards the waste to avoid contamination with the previous sample.
- b. **Sample extraction.** V2 switches to position “A”; 500 µL of sample and 500 µL of extractant are aspirated through syringes S3 and S2, respectively. Position B of V2 is selected and sample and extractant are pumped slowly towards the mixing coil, where the two phases are mixed and get in contact as intercalated small drops. In this way, the previous solution placed in MC is displaced towards the waste by the new sample mixture through V3.
- c. **Phase separation.** Then S2 and S3 pump the mixed phases slowly towards the separation unit (SU) through V3 in “on” position until the entire sample has left the MC. Here, an instant phase separation is

observed.

- d. **Extract analysis.** With the multiposition valve (V1) in the position “3”, S1 aspirates 300 μL of aqueous phase from the bottom of SU. Position “1” is selected and the extract is pumped towards the flow-cell (filled with C_{18} solid microbeads) using a suitable amount of MeOH:H₂O carrier solution (1700 μL , previously charged); the analyte is retained on the solid microbeads and the signal is registered. After leaving the flow cell, the sample is carried to the waste.

System cleaning. A double cleaning stage is performed in order to remove all sample residues before the next analysis. First, the remaining content of the SU is aspirated by S4 by selecting the “A” position of V2 and the residue is sent to the waste. Then, the valve is changed to “B” position and 700 μL of sample carrier (S3) and 700 μL of water (S2) are passed through the MC to the SU, where the mixture is collected by S4 towards the waste after change the V2 position again. Finally, this cleaning is repeated with an additional step: S1 pumps 500 μL of MeOH:H₂O carrier solution in order to clean the extract collection tube through V1 in position 3.

Table 1. Operational routine of the MSFIA manifold

Step	Description	Active devices ^a	Action
Sampling tube cleaning			
1	Sample aspiration	S4; V2 (B)	Aspirate 0.5 mL (3 mL min ⁻¹)
2	Dispensing sample into the waste	-	Dispense 0.5 mL (15 mL min ⁻¹)
Sample extraction			
3	Sample aspiration	S3; V2 (A)	Aspirate 0.5 mL (3 mL min ⁻¹)
4	Dispensing sample and extractant through the MC	S2; S3; V2 (B)	Dispense 0.5 mL (0.5 mL min ⁻¹)
Phase separation			
5	Refilling of syringes	-	Aspirate 0.5 mL (3 mL min ⁻¹)
6	Dispensing the mixture into the SU	S2; S3; V3	Dispense 0.5 mL (0.5 mLmin ⁻¹)
Extract analysis			
7	Refilling of syringes	-	Aspirate 1.7 mL (15 mL min ⁻¹)
8	Extract aspiration	S1; V1 (3)	Aspirate 0.3 mL (15 mL min ⁻¹)
9	Dispensing extract towards the detector	S1; V1 (1)	Dispense 2.0 mL (1 mL min ⁻¹)
System Cleaning			
10	Aspirate SU content	S4; V2 (A)	Aspirate 0.9 mL (15 mL min ⁻¹)
11	Dispensing into the waste	-	Dispense 0.9 mL (15 mL min ⁻¹)
12	Refilling of syringes	-	Aspirate 1.5 mL (15 mL min ⁻¹)
13	Dispensing heptane and extractant through the MC	S2; S3; V2 (B)	Dispense 0.7 mL (1 mL min ⁻¹)
14	Aspirate SU content	S4; V2 (A)	Aspirate 1.4 mL (15 mL min ⁻¹)
15	Dispensing into the waste	-	Dispense 1.4 mL (15 mL min ⁻¹)
16	Dispensing heptane and extractant through the MC	S2; S3; V2 (B)	Dispense 0.7 mL (1 mL min ⁻¹)
17	Dispensing extract carrier through V1 and SU	S1; V1 (3)	Dispense 0.5 mL (1 mL min ⁻¹)
18	Aspirate SU content	S4; V2 (A)	Aspirate 2.0 mL (15 mL min ⁻¹)
19	Dispensing into the waste	-	Dispense 2.0 mL (15 mL min ⁻¹)

^aThis column shows when a syringe or valve is active in each step. The position of V1 and V2 is indicated in brackets.

Reference method

The reference method was performed according to the European Standard (European Committee for Standardization 2005). This method consists in a dilution of 25 mL food simulant with hexane (1:1, v:v), followed by liquid-liquid extraction with 10 mL of the same solution used as chromatographic mobile phase (MeOH:water, 55:45, v:v). Two consecutive extractions are performed, the extracts are combined and diluted to 25 mL prior HPLC-UV analysis.

Results and discusión

MSFIA configuration and optimisation of the extraction

The parameters controlling each step of the process, from the on-line LLE until the fluorescence signal recording, were carefully optimised to obtain the highest sensitivity (good recovery yields) and precision (both repeatability and intermediate precision).

Initially, the liquid-liquid extraction was performed by using the 8-port multiposition valve, as well as the four syringes. However, when all the required solvent were introduced into the system by the same multi-position valve, a memory effect was observed due to only partial cleaning of the system between different samples. This handicap arose probably due to the different density and affinity of the solvents for the tubing. The memory effect is shown in Figure 2(a), in which a sample analysis is followed by 3 blank analyses; it can be observed the gradual decrease of the blank signal, hence minimising sample frequency due to the troublesome cleaning of the system. Hence, we added another

valve so that the aqueous and organic solvents were separated in the system.

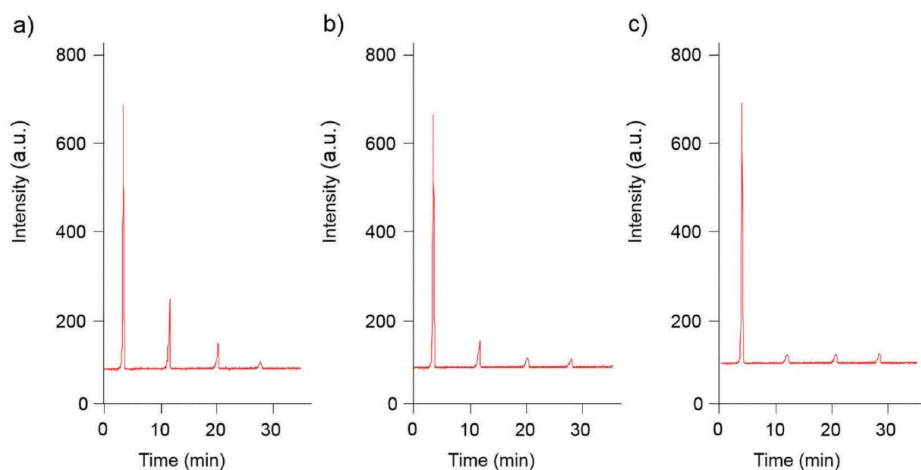


Figure 2. Flow profiles obtained during the optimisation of the cleaning procedure between samples; 6 mg kg^{-1} DHBP.

When the final configuration was selected (Figure 1), different approaches were tested to optimise the cleaning of the system between samples. Among them, using ethanol as cleaning solvent or performing high dilutions of the oil sample still produced problems recovering the blank signal (Figure 2(b)). Finally, we performed the sample-to-sample cleaning step with heptane and water, as described in Table 1, observing an immediate recovery of the blank signal (Figure 2 (c)), hence maximising sample throughput.

Once the optimum configuration was selected, the next step consisted in the optimisation of the liquid-liquid extraction inside the vial placed in the manifold (Figure 1). The same volumes of sample (diluted with heptane) and extractant (deionised water) were used, setting a high flow-rate (5 mL min^{-1}) to maximise sample throughput.

Although different residence times were tested in the vial, the analytical signals (dependent on the extraction yield) were very low. We also tried to insert air bubbles in the vial to improve the extraction, without observing any clear improvement. We thus performed different experiments at lower flow-rates (range 0.125–2.5 mL min⁻¹). The analytical signal improved significantly at lower rates, hence indicating that the extraction of the analyte took place inside the mixing coil placed before the vial (separation unit) due to the formation of micro-bubble of organic and aqueous phases, which boosted the extraction step. As a result, an optimum flow-rate of 0.5 mL min⁻¹ was selected, and the required residence time in the separation vial was studied up to 60 seconds. It was observed that an instant separation of the phases took place, hence the aqueous phase could be immediately carried towards the detection area.

The volumes of sample and extractant (water) were optimised. Extractant: sample ratios between 1:1 and 2:1 were tested, but no significant improvement was observed when the extractant ratio was increased. We thus selected an extractant: sample ratio of 1:1 (500 µL each) to avoid additional dilution, hence improving sensitivity. The aspirated volume of the extracted sample was studied in the range of 50–500 µL, selecting 300 µL, which provided the required sensitivity (fulfilling the specific migration limit of DHBP) as well as satisfactory sampling frequency and low waste generation.

Fluorescence spectra and instrumental parameters

First of all, we measured the fluorescence signal in homogeneous

solution using the instrument setup and conditions described above. However, as the recorded signal was very low, we incorporated a suitable solid support in the flow cell (C₁₈ silica gel microbeads) to perform an on-line preconcentration of the analyte, improving the sensitivity of the method. Hence, excitation and emission spectra were directly recorded with the analyte retained on C₁₈ solid microbeads. Optimum excitation/emission wavelengths of 267/355 nm were used for the following experiments. The influence of the photomultiplier tube voltage (400–800 V) and instrument excitation/emission slit widths (5–20 nm) were studied. These parameters were critical due to the background signal of the solid support. We selected as optimum values 650 V (photomultiplier tube) and 5/10 nm for excitation/emission slit widths. These values provided the required sensitivity for the intended applications.

Interference study

The aim of this work was to propose a novel automated method for performing migration tests in oils for 4,4'-dihydroxybiphenyl. Hence, studying the potential interference of other compounds that may be present was mandatory. We considered that no interference took place if the variation of the signal was lower than 4% – the typical Relative Standard Deviation (RSD) of the method within a working day – after the addition of the interferent. This study was performed for the following compounds (the most common potential migrants in plastics): terephthalic acid, isophthalic acid, ethylene glycol, diethylene glycol, dimethyl phthalate, diethyl phthalate, Irganox® 1076, Irganox® 1010,

4,4'-dihydroxybenzophenone, and bisphenol A. In all cases, the tolerance was higher than 20 (maximum interference/analyte ratio tested; w/w). All the compounds assayed have specific migration limits higher than 4,4'-dihydroxybyphenyl; hence, the maximum tolerance level was much higher than the potential ratio if several migrants were present in the sample. As a result, this study demonstrates the selectivity of the method developed.

Analytical parameters

The obtained analytical parameters are shown in Table 2. Under the optimum conditions, method detection and quantitation limits of 0.05 and 0.16 mg kg⁻¹ were obtained, respectively. It is important to mention that these values are not instrumental detection/quantitation limits, but concentrations in real oil samples. Therefore, these values provide enough sensitivity to fulfil the specific migration limit of 6 mg kg⁻¹. Both parameters were calculated as the concentration of analyte that produces a signal equivalent to three and ten times, respectively, the standard deviation of a blank oil sample. Repeatability (n = 10, same day) and intermediate precision (n = 10, 3 consecutive days) were calculated by the analysis of a real oil sample spiked at 1 mg kg⁻¹. In both cases, Relative Standard Deviations (RSD) lower than 5% were achieved.

Table 2. Analytical parameters.

Parameter	
Calibration graph	
Intercept	24.192
Slope (kg mg ⁻¹)	101.13
Correlation coefficient	0.9995
Linear dynamic range (mg kg ⁻¹)	0.16-9
Detection limit (mg kg ⁻¹)	0.05
Quantitation limit (mg kg ⁻¹)	0.16
Repeatability (%) ^a	3.5
Intermediate precision (%) ^a	4.9
Sample throughput (h ⁻¹)	7

^an = 10; 1 mg kg⁻¹

A sample throughput of seven samples per hour was achieved (as can be observed in Figure 3). The CEN standard chromatographic migration test involves an off-line LLE followed by the chromatographic analysis, which implies more than one hour per sample. These sample throughputs include both the extraction procedure and the analytical measurement. In addition, the proposed method requires lower consumption of sample and reagents (0.5 mL of sample and 3.7 mL of organic solvents) than the official method (12.5 mL of sample and 37.5 mL of organic solvents), therefore minimising wastes generation, which is in agreement with the principles of green chemistry. A flow profile obtained during the calibration step is shown in Figure 3.

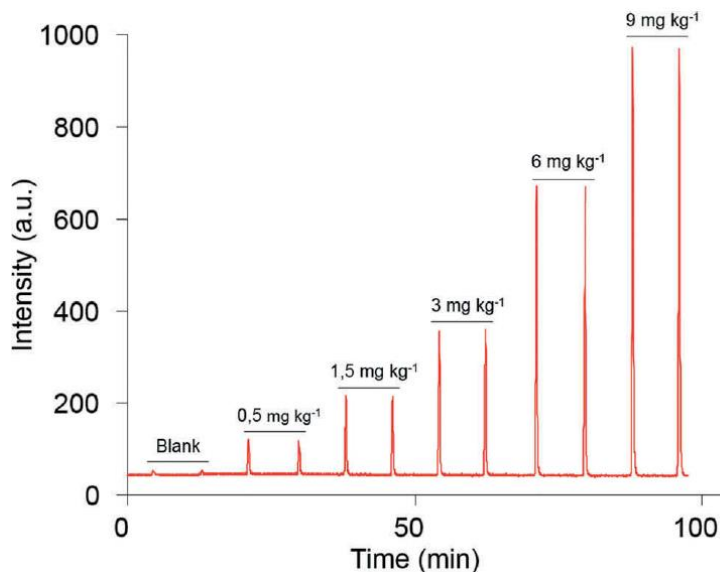


Figure 3. Flow profiles obtained in the calibration graph.

Analytical applications

We applied the analytical method to the quantitation of 4,4'-dihydroxybiphenyl in two batches of three different plastics: polyethylene terephthalate (PET), polyethylene (PE), and polycarbonate (PC). In all cases, the levels of the analyte were below the limit of detection of the method (results confirmed by the official HPLC migration test). Therefore, we performed recovery experiments, spiking each sample at three different concentrations (the specific migration limit of the analyte is 6 mg kg⁻¹, so we spiked the samples at similar concentrations). Recoveries ranged between 94 and 106% in all cases, results that were in-line with those found with the official test. The precision and recoveries of both methods were compared by the F-test and Student's t-test at a 95% confidence level, observing no significant differences. Detailed results are shown in Table 3.

Table 3. Recovery studies in different plastic probes.

Sample	Spiked (mg kg ⁻¹)	Recovery (%) ± RSD ^a		Statistical parameters	
		Proposed method	HPLC	F ^b	t ^c
PET-1	0	<M.D.L.	<M.D.L.	–	–
	0.2	105 ± 2	98 ± 1	10.00	2.82
	4	96 ± 2	103 ± 2	2.00	4.22
	8	94 ± 2	100 ± 1	10.37	3.86
PET-2	0	<M.D.L.	<M.D.L.	–	–
	0.5	98 ± 1	98 ± 1	6.05	0.06
	4	94 ± 3	98 ± 3	1.82	1.30
	6	96 ± 1	96 ± 1	2.25	0.16
PC-1	0	<M.D.L.	<M.D.L.	–	–
	0.2	106 ± 3	98 ± 2	14.14	1.77
	4	97 ± 3	91 ± 1	15.44	2.19
	8	99 ± 2	93 ± 1	16.64	2.81
PC-2	0	<M.D.L.	<M.D.L.	–	–
	0.5	99 ± 2	96 ± 1	6.05	0.96
	2	105 ± 2	96 ± 1	10.12	4.05
	6	95 ± 1	97 ± 1	5.88	1.81
PE-1	0	<M.D.L.	<M.D.L.	–	–
	0.2	102 ± 3	99 ± 2	8.27	0.90
	4	98 ± 1	94 ± 1	6.86	2.59
	8	97 ± 2	96 ± 1	16.64	0.30
PE-2	0	<M.D.L.	<M.D.L.	–	–
	0.5	102 ± 3	101 ± 2	8.71	0.34
	2	97 ± 1	99 ± 1	3.55	1.28
	6	102 ± 1	100 ± 1	2.61	2.62

^an = 3^bTheoretical value for P = 0.05; F = 19.00^cTheoretical value for P = 0.05; t = 4.30

M.D.L. = Method detection limit

Conclusions

In this work, we propose an alternative analytical method to the already established chromatographic standard tests for specific migration analysis. By using an MSFIA manifold, the liquid-liquid extraction was performed on-line. Then, the use of a flow luminescence sensor allowed the sensitive and selective quantitation of the analyte. When compared to the standard chromatographic migration test (conventional liquid-liquid extraction), the method proposed achieves a drastic reduction in volumes of sample and organic solvents, an increase in sample throughput from 1 to 7 samples per hour, as well as the automation of the extraction procedure. No statistical differences were observed between this method and the standard one. The method proposed presents additional potential for other analytes, as the extractant solvent can be optimised depending on the target analytes. In addition, this on-line LLE can also be coupled to HPLC as a previous sample treatment, allowing multiparameter analyses. Therefore, the strategy here developed could be implemented in laboratory analysis to minimise reagents waste and improve sample frequency in specific migration tests.

Disclosure statement

The authors declare that they have no conflict of interest.

Funding

Technical and human support provided by CICT of Universidad de

Jaén (UJA, MINECO, Junta de Andalucía, FEDER) is gratefully acknowledged. This study was funded by “Ministerio de Economía y Competitividad” (grant number CTQ2016-7511-R); Ministerio de Economía y Competitividad [CTQ2016-7511-R].

References

- Alexovič M, Horstkotte B, Šrámková I, Solich P, Sabo J. 2017. Automation of dispersive liquid–liquid microextraction and related techniques. Approaches based on flow, batch, flow-batch and in-syringe modes. *TrAC - Trends Anal Chem.* 86:39–55.
- Anastas P, Eghbali N. 2010. Green chemistry: principles and practice. *Chem Soc Rev.* 39:301–312.
- Arvanitoyannis IS, Kotsanopoulos KV. 2013. Migration phenomenon in food packaging. Food-package interactions, mechanisms, types of migrants, testing and relative legislation-a review. *Food Bioprocess Technol.* 7:21–36.
- Asrar J, Toriumi H, Watanabe J, Krigbaum WR, Ciferr A, Carolina N, Preston J, Textiles M. 1983. Thermotropic homopolyesters. I. The preparation and properties of polymers based on 4,4'-dihydroxybiphenyl. *J Polym Sci B Polym Phys.* 21:1119–1131.
- Bang DY, Kyung M, Kim MJ, Jung BY, Cho MC, Choi SM, Kim YW, Lim SK, Lim DS, Won AJ, et al. 2012. Human risk assessment of endocrine-disrupting chemicals derived from plastic food containers. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 11:453–470.
- Eckardt M, Greb A, Simat TJ. 2018. Polyphenylsulfone (PPSU) for baby bottles – a comprehensive assessment on polymer related non-

intentionally added substances (NIAS). *Food Addit Contam Part A*. 35:1421–1437.

European Committee for Standardization. 2004. EN 13130-1. Materials and articles in contact with foodstuffs. Plastics substances subject to limitation. Part 1: Guide to test methods for the specific migration of substances from plastics to foods and food simulants and the determination of substances in plastics and the selection of conditions of exposure to food simulants.

European Committee for Standardization. 2005. CEN/TS 13130-18. Materials and articles in contact with foodstuffs. Plastics substances subject to limitation. Part 18: Determination of 1,2-dihydroxybenzene, 1,3-dihydroxybenzene, 1,4-dihydroxybenzene, 4,4'-dihydroxybenzophenone and 4,4'-dihydroxybiphenyl in food simulants.

European Union. 2011. Commission Regulation (EU) No 10/2011 of 14 January 2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food. *Off J Eur Union*. L12:1–89.

Groh KJ, Backhaus T, Carney-Almroth B, Guecke B, Inostroza PA, Lennquist A, Leslie HA, Maffini M, Slunge D, Trasande L, et al. 2019. Overview of known plastic packaging-associated chemicals and their hazards. *Sci Total Environ*. 651:3253–3268.

Horstkotte B, Fikarová K, Cocovi-Solberg DJ, Sklenářová H, Solich P, Miró M. 2017. Online coupling of fully automatic in-syringe dispersive liquid-liquid microextraction with oxidative back-extraction to inductively coupled plasma spectrometry for sample clean-up in elemental analysis: A proof of concept. *Talanta*. 173:79–87.

Humme DO. 2002. *Atlas of Plastics Additives: analysis by Spectrometric Methods*. Berlin (Germany): Springer-Verlag Heidelberg New York.

- Kricheldop HR, Sun S, Sapich B, Stumpe J, Chemie I, Universitat AH. 1997. Polymers of carbonic acid, 23a) Photoreactive cholesteric polycarbonates based on isosorbide, 4,4'-dihydroxychalcone and 4,4'-dihydroxy biphenyl. *Macromol Chem Phys*. 198:2197–2210.
- Kumar P. 2018. Role of Plastics on Human Health. *Indian J Pediatr*. 85:384–389.
- Lau O-W, Wong S-K. 2000. Contamination in food from packaging material. *J Chromatogr A*. 882:255–277.
- Llorent-Martínez EJ, Ortega-Barrales P, Fernández-deCórdova ML, Ruiz-Medina A. 2011. Trends in flow-based analytical methods applied to pesticide determination: A review. *Anal Chim Acta*. 684:30–39.
- Martinis EM, Escudero LB, Berton P, Monasterio RP, Filippini MF, Wuilloud RG. 2011. Determination of inorganic selenium species in water and garlic samples with on-line ionic liquid dispersive microextraction and electrothermal atomic absorption spectrometry. *Talanta*. 85:2182–2188.
- Miró M, Cerdà V, Estela JM. 2002. Multisyringe flow injection analysis: characterization and applications. *TrAC – Trends Anal Chem*. 21:199–210.
- Nerin C, Bentayeb K, Rodriguez-Lafuente A. 2012. Sampling techniques for the determination of migrants from packaging materials in food. In: Pawliszyn J, editor. *Comprehensive Sampling and Sample Preparation*. Oxford (UK): Elsevier Inc; p. 357–379.
- Nishihara T, Nishikawa J, Kanayama T, Dakeyama F, Saito K, Imagawa M, Takatori S, Kitagawa Y, Hori S, Utsumi H. 2000. Estrogenic activities of 512 chemicals by yeast two-hybrid assay. *J Heal Sci*. 46:282–298.

- Olsen CM, Meussen-elholm ETM, Samuelsen M, Holme JA, Hongslo JK. 2003. Effects of the environmental oestrogens bisphenol A, tetrachlorobisphenol A, tetrabromobisphenol A, 4-hydroxybiphenyl and 4,4'-dihydroxybiphenyl on oestrogen receptor binding, cell proliferation and regulation of oestrogen sensitive proteins in the human breast cancer cell line MCF-7. *Pharmacol Toxicol.* 92:180–188.
- Sanchis Y, Yusà V, Coscollà C. 2017. Analytical strategies for organic food packaging contaminants. *J Chromatogr A.* 1490:22–46.
- Silvestre CIC, Santos JLM, Lima JLFC, Zagatto EAG. 2009. Liquid-liquid extraction in flow analysis: A critical review. *Anal Chim Acta.* 652:54–65.
- Škrliková J, Andruch V, Sklenářová H, Chocholouš P, Solich P, Balogh IS. 2010. A novel dual-valve sequential injection manifold (DV-SIA) for automated liquid-liquid extraction. Application for the determination of picric acid. *Anal Chim Acta.* 666:55–61.
- Spietelun A, Marcinkowski Ł, De La Guardia M, Namieśnik J. 2014. Green aspects, developments and perspectives of liquid phase microextraction techniques. *Talanta.* 119:34–45.
- Wang X, Xu G, Chen P, Sun Y, Yao X, Lv Y, Guo W, Wang G. 2018. Fully-automated magnetic stirring-assisted lab-insyringe dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of arsenic species in rice samples. *RSC Adv.* 8:16858–16865.

CONCLUSIONES

5. Conclusiones

Durante el transcurso de la presente Tesis Doctoral, se han desarrollado cuatro métodos de análisis en los que se consigue la automatización de al menos una etapa del tratamiento de muestra mediante el uso de sistemas automáticos de análisis en flujo SIA y MSFIA con detección espectrofluorimétrica. De los resultados obtenidos en estos trabajos, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- Se ha conseguido una mejora sustancial en la capacidad de separación de los optosensores en flujo desarrollados, mediante la combinación del uso de una cantidad adicional de soporte sólido en el interior de la propia célula de flujo con la optimización de las condiciones de elución, posibilitando por primera vez la separación de hasta cuatro analitos en un mismo análisis.

La cantidad adicional de soporte sólido lleva a cabo las funciones de una minicolumna de SPE, posibilitando la retención, separación y posterior detección secuencial de los analitos. Al realizarse la separación y la detección en la propia célula de flujo del detector, se consigue la simplificación del sistema, evitando el uso de minicolumnas o cartuchos de separación. De este modo se ha logrado minimizar los fenómenos de dispersión y dilución asociados al uso de estos sistemas.

- Se ha contribuido a la mejora de la automatización de la LLE convencional para la extracción de analitos orgánicos en muestras acuosas. Gracias al uso de diferentes jeringas para las disoluciones de carácter acuoso y para el extractante orgánico,

se consigue evitar problemas asociados a las diferentes afinidades de las fases por los tubos de teflón (formación de burbujas o desplazamientos no deseados de las fases en el interior de los tubos).

- Se ha desarrollado, por primera vez, un método automático para la extracción de compuestos orgánicos en matrices oleosas. La separación de las vías por las que circulan las fases acuosas y orgánicas fue clave para evitar contaminación cruzada y conseguir resultados reproducibles.
- En todos los métodos desarrollados se consigue una reducción significativa del consumo de disolventes orgánicos, así como un incremento de la frecuencia de muestreo, lo cual los hace muy interesantes en laboratorios de rutina que realizan este tipo de análisis, donde el tratamiento de muestra suele ser la etapa más crítica en cualquier tipo de análisis.
- Los métodos desarrollados, aplicados a muestras reales, proporcionan parámetros analíticos adecuados, obteniendo resultados similares a los métodos cromatográficos empleados como referencia.

Como conclusión final, los sistemas desarrollados en el transcurso de esta Tesis Doctoral demuestran el potencial de los sistemas de análisis en flujo para la automatización del tratamiento de muestra, ya que son altamente configurables y adaptables al análisis de diferentes analitos, mediante la optimización de las condiciones de separación y/o extracción en función de los compuestos a analizar.

BIBLIOGRAFÍA

6. Bibliografía

- [1] J. Skeggs Leonard T., *An Automatic Method for Colorimetric Analysis*, Am. J. Clin. Pathol. 28 (1957) 311–322.
- [2] J. Ružička, E.H. Hansen, *Flow injection analyses. Part I. A new concept of fast continuous flow analysis*, Anal. Chim. Acta. 78 (1975) 145–157.
- [3] C. Rees, L. Pender, K. Sherrin, C. Schwanger, P. Hughes, S. Tibben, A. Marouchos, M. Rayner, *Methods for reproducible shipboard SFA nutrient measurement using RMNS and automated data processing*, Limnol. Oceanogr. Methods. 17 (2019) 25–41.
- [4] T.K. Rho, S. Coverly, E.S. Kim, D.J. Kang, S.H. Kahng, T.H. Na, S.R. Cho, J.M. Lee, C.R. Moon, *Practical considerations for the segmented-flow analysis of nitrate and ammonium in seawater and the avoidance of matrix effects*, Ocean Sci. J. 50 (2015) 709–720.
- [5] A.R. Sousa, M.A. Trancoso, *Validation of an environmental friendly segmented flow method for the determination of phenol index in waters as alternative to the conventional one*, Talanta. 79 (2009) 796–803.
- [6] M.R. Yaftian, M.I.G.S. Almeida, R.W. Cattrall, S.D. Kolev, *Flow injection spectrophotometric determination of V(V) involving on-line separation using a poly(vinylidene fluoride-co-hexafluoropropylene)-based polymer inclusion membrane*, Talanta. 181 (2018) 385–391.
- [7] S. Chaneam, K. Kaewyai, T. Mantim, R. Chaisuksant, P. Wilairat, D. Nacapricha, *Simultaneous and direct determination of urea and creatinine in human urine using a cost-effective flow injection system equipped with in-house contactless conductivity detector and LED colorimeter*, Anal. Chim. Acta. 1073 (2019) 54–61.
- [8] J.A. Murillo Pulgarín, L.F. García Bermejo, A. Carrasquero Durán, *A fast and simple FIA-chemiluminescence method for the evaluation of*

- Roselle flowers as scavenger of the free radicals generated by UV irradiated antibiotics*, J. Pharm. Biomed. Anal. 164 (2019) 630–635.
- [9] C.A. Sanchez, J.A. Rodríguez, M.E. Paez-Hernandez, E.M. Santos, Y. Castrillejo, *Zero-valent Iron Nanoparticles Modified Screen-printed Electrode for FIA or HPLC Amperometric Detection of Metronidazole in Pharmaceutical Formulations*, Electroanalysis. 31 (2019) 329–334.
- [10] J. Ružička, G.D. Marshall, *Sequential injection: a new concept for chemical sensors, process analysis and laboratory assays*, Anal. Chim. Acta. 237 (1990) 329–343.
- [11] B.F. Reis, M.F. Giné, E.A.G. Zagatto, J.L.F.C. Lima, R.A. Lapa, *Multicommutation in flow analysis. Part 1. Binary sampling: concepts, instrumentation and spectrophotometric determination of iron in plant digests*, Anal. Chim. Acta. 293 (1994) 129–138.
- [12] V. Cerdà, J.M. Estela, R. Forteza, A. Cladera, E. Becerra, P. Altimira, P. Sitjar, *Flow techniques in water analysis*, Talanta. 50 (1999) 695–705.
- [13] R.A.S. Lapa, J.L.F.C. Lima, B.F. Reis, J.L.M. Santos, E.A.G. Zagatto, *Multi-pumping in flow analysis: Concepts, instrumentation, potentialities*, Anal. Chim. Acta. 466 (2002) 125–132.
- [14] Y. Bazel, A. Tupys, Y. Ostapiuk, O. Tymoshuk, J. Imrich, J. Šandrejová, *A simple non-extractive green method for the spectrophotometric sequential injection determination of copper(ii) with novel thiazolylazo dyes*, RSC Adv. 8 (2018) 15940–15950.
- [15] B. Wibowotomo, J.B. Eun, J. Il Rhee, *Development of a sequential injection analysis system for the determination of saccharin*, Sensors. 17 (2017) 2891.
- [16] C.S. Dourado, E.S. Lins, A.C.B. Dias, *Development of a sequential injection system with online photo-cleavage coupled to SPE for spectrophotometric determination of N-nitrosoglyphosate*, Microchem. J. 147 (2019) 1061–1067.

- [17] S.A.P. Pereira, F.A.R. Mota, I. Çay, M.L.C. Passos, A.R.T.S. Araujo, M.L.M.F.S. Saraiva, *Automatic fluorometric lactate determination in human plasma samples*, *New J. Chem.* 44 (2019) 543–548.
- [18] D.A.V. Medina, Á.J. Santos-Neto, V. Cerdà, F. Maya, *Automated dispersive liquid-liquid microextraction based on the solidification of the organic phase*, *Talanta.* 189 (2018) 241–248.
- [19] K. Kołacińska, Z. Samczyński, J. Dudek, A. Bojanowska-Czajka, M. Trojanowicz, *A comparison study on the use of Dowex 1 and TEVA-resin in determination of ⁹⁹Tc in environmental and nuclear coolant samples in a SIA system with ICP-MS detection*, *Talanta.* 184 (2018) 527–536.
- [20] A.R. Costa, M.L.C. Passos, P.C.A.G. Pinto, S.A.P. Pereira, M.L.M.F.S. Saraiva, *The role of ionic liquids in the biocatalytic evaluation of bisphenol levels as contaminant: An automatic approach*, *Analyst.* 143 (2018) 2426–2434.
- [21] T. Masadome, H. Arai, *Sequential Injection Analysis of Anionic Surfactants Using On-line Preconcentration Technique and a Microfluidic Polymer Chip with an Embedded Ion-Selective Electrode as a Detector*, *Electrochemistry.* 86 (2018) 122–127.
- [22] J. Jiménez-López, J.L.M. Santos, P. Ortega-Barrales, A. Ruiz-Medina, *New Perspectives of Quantum Dots in the Food Field: Determination of β -Carotene in Tropical Fruit Juices and Food Supplements*, *Food Anal. Methods.* 10 (2017) 2412–2421.
- [23] G.F. Pinto, D.L. Rocha, E.M. Richter, R.A.A. Muñoz, S.G. Da Silva, *A multicommuted flow system for spectrophotometric determination of formaldehyde in Mushroom*, *J. Braz. Chem. Soc.* 29 (2018) 1400–1405.
- [24] J. Jiménez-López, P. Ortega-Barrales, A. Ruiz-Medina, *Development of an semi-automatic and sensitive photochemically induced fluorescence sensor for the determination of thiamethoxam in vegetables*, *Talanta.* 149 (2016) 149–155.

- [25] E.J. Llorent-Martínez, L. Molina-García, R. Kwiatkowski, A. Ruiz-Medina, *Application of quantum dots in clinical and alimentary fields using multicommutated flow injection analysis*, *Talanta*. 109 (2013) 203–208.
- [26] E. Llorent-Martínez, P. Barrales, M. Fernández-de Cordova, A. Ruiz-Medina, *Multicommutation in Flow Systems: A Useful Tool for Pharmaceutical and Clinical Analysis*, *Curr. Pharm. Anal.* 6 (2010) 53–65.
- [27] P. Phansi, K. Danchana, S.L.C. Ferreira, V. Cerdà, *Multisyringe flow injection analysis (MSFIA) for the automatic determination of total iron in wines*, *Food Chem.* 277 (2019) 261–266.
- [28] K. Danchana, C.T. de Souza, E. Palacio, V. Cerdà, *Multisyringe flow injection analysis for the spectrophotometric determination of uranium (VI) with 2-(5-bromo-2-pyridylazo)-5-diethylaminophenol*, *Microchem. J.* 150 (2019) 104148.
- [29] D. Salazar-Beltrán, L. Hinojosa-Reyes, E. Ruiz-Ruiz, A. Hernández-Ramírez, J. Luis Guzmán-Mar, *Determination of phthalates in bottled water by automated on-line solid phase extraction coupled to liquid chromatography with uv detection*, *Talanta*. 168 (2017) 291–297.
- [30] F.A. de Santana, L.A. Portugal, A.M. Serra, L. Ferrer, V. Cerdà, S.L.C. Ferreira, *Development of a MSFIA system for sequential determination of antimony, arsenic and selenium using hydride generation atomic fluorescence spectrometry*, *Talanta*. 156–157 (2016) 29–33.
- [31] K. Danchana, S. Clavijo, V. Cerdà, *Conductometric Determination of Sulfur Dioxide in Wine Using a Multipumping System Coupled to a Gas-Diffusion cell*, *Anal. Lett.* 52 (2019) 1363–1378.
- [32] M.K. Sasaki, M.A. Feres, E.A.G. Zagatto, *Flow systems with MnO₂-coated open tubular reactors for spectrophotometric determination of ascorbic acid in pharmaceutical products*, *Anal. Lett.* 49 (2016) 627–

- 638.
- [33] C.F. Nascimento, M.A.S. Brasil, S.P.F. Costa, P.C.A.G. Pinto, M.L.M.F.S. Saraiva, F.R.P. Rocha, *Exploitation of pulsed flows for on-line dispersive liquid–liquid microextraction: Spectrophotometric determination of formaldehyde in milk*, *Talanta*. 144 (2015) 1189–1194.
- [34] J. Ruzicka, *Lab-on valve: Universal microflow analyzer based on sequential and bead injection*, *Analyst*. 125 (2000) 1053–1060.
- [35] E. Mattio, F. Robert-Peillard, L. Vassalo, C. Branger, A. Margailan, C. Brach-Papa, J. Knoery, J.L. Boudenne, B. Coulomb, *3D-printed lab-on-valve for fluorescent determination of cadmium and lead in water*, *Talanta*. 183 (2018) 201–208.
- [36] K. Kołacińska, T.A. DeVol, A.F. Seliman, V.N. Bliznyuk, J. Dudek, M.K. Dudek, P. Piotrowski, M. Trojanowicz, *Application of new covalently-bound diglycolamide sorbent in sequential injection analysis flow system for sample pretreatment in ICP-MS determination of ²³⁹Pu at ppt level*, *Talanta*. 205 (2019) 120099.
- [37] A. González, S. Clavijo, V. Cerdà, *Estrogens determination exploiting a SIA-LOV system prior in-port derivatization-large volume injection-programmable temperature vaporization-gas chromatography*, *Talanta*. 194 (2019) 852–858.
- [38] J.L.A. Miranda, R.B.R. Mesquita, A. Nunes, M. Rangel, A.O.S.S. Rangel, *Determination of iron(III) in water samples by microsequential injection solid phase spectrometry using an hexadentate 3-hydroxy-4-pyridinone chelator as reagent*, *Talanta*. 191 (2019) 409–414.
- [39] N. Teshima, D. Noguchi, Y. Joichi, N. Lenghor, N. Ohno, T. Sakai, S. Motomizu, *Simultaneous Injection-Effective Mixing Analysis of Palladium*, *Anal. Sci.* 26 (2010) 143–144.
- [40] D. Nacapricha, P. Sastranurak, T. Mantim, N. Amornthammarong, K. Uraisin, C. Boonpanaid, C. Chuyprasartwattana, P. Wilairat, *Cross*

- injection analysis: Concept and operation for simultaneous injection of sample and reagents in flow analysis*, Talanta. 110 (2013) 89–95.
- [41] F. Maya, J.M. Estela, V. Cerdà, *Completely automated in-syringe dispersive liquid-liquid microextraction using solvents lighter than water*, Anal. Bioanal. Chem. 402 (2012) 1383–1388.
- [42] K. Ponghong, N. Teshima, K. Grudpan, J. Vichapong, S. Motomizu, T. Sakai, *Successive determination of urinary bilirubin and creatinine employing simultaneous injection effective mixing flow analysis*, Talanta. 133 (2015) 71–76.
- [43] N. Ratanawimarnwong, K. Ponghong, N. Teshima, D. Nacapricha, K. Grudpan, T. Sakai, S. Motomizu, *Simultaneous injection effective mixing flow analysis of urinary albumin using dye-binding reaction*, Talanta. 96 (2012) 50–54.
- [44] K. Uraisin, S. Janya, C. Phechkrajang, N. Choengchan, W. Tiyapongpattana, V. Cerdà, D. Nacapricha, *Chemometrics-assisted cross injection analysis for simultaneous determination of phosphate and silicate*, Int. J. Environ. Anal. Chem. 96 (2016) 886–903.
- [45] N. Choengchan, T. Mantim, P. Inpota, D. Nacapricha, P. Wilairat, P. Jittangprasert, W. Waiyawat, S. Fucharoen, P. Sirankpracha, N.P. Morales, *Tandem measurements of iron and creatinine by cross injection analysis with application to urine from thalassemic patients*, Talanta. 133 (2015) 52–58.
- [46] B. Horstkotte, P. Solich, *The automation technique lab-in-syringe: A practical guide*, Molecules. 25 (2020) 1–23.
- [47] K. Fikarová, B. Horstkotte, H. Sklenářová, F. Švec, P. Solich, *Automated continuous-flow in-syringe dispersive liquid-liquid microextraction of mono-nitrophenols from large sample volumes using a novel approach to multivariate spectral analysis*, Talanta. 202 (2019) 11–20.
- [48] R.M. Frizzarin, F. Maya, J.M. Estela, V. Cerdà, *Fully-automated in-*

- syringe dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of caffeine in coffee beverages*, Food Chem. 212 (2016) 759–767.
- [49] G. Giakisikli, A.N. Anthemidis, *Automatic pressure-assisted dual-headspace gas-liquid microextraction. Lab-in-syringe platform for membraneless gas separation of ammonia coupled with fluorimetric sequential injection analysis*, Anal. Chim. Acta. 1033 (2018) 73–80.
- [50] I. Šrámková, B. Horstkotte, H. Sklenářová, P. Solich, S.D. Kolev, *A novel approach to Lab-In-Syringe Head-Space Single-Drop Microextraction and on-drop sensing of ammonia*, Anal. Chim. Acta. 934 (2016) 132–144.
- [51] J. Ružička, *Recent advances in flow injection technique-sequential injection sensor injection and sinusoidal flow*, Anal. Sci. 7 (1991) 635–637.
- [52] J. Ružička, *The second coming of flow-injection analysis*, Anal. Chim. Acta. 261 (1992) 3–10.
- [53] A. Ivaska, J. Ružička, *From Flow Injection to Sequential Injection: Comparison of Methodologies and Selection*, Analyst. 118 (1993) 885–889.
- [54] A. Cladera, C. Tomàs, E. Gómez, J.M. Estela, V. Cerdà, *A new instrumental implementation of sequential injection analysis*, Analyst. 302 (1995) 297–308.
- [55] P.C.A.G. Pinto, M. Lúcia, M.F.S. Saraiva, J.L.F.C. Lima, *Sequential Injection Analysis Hyphenated with Other Flow Techniques : A Review*, Anal. Lett. 44 (2018) 374–397.
- [56] M. Trojanowicz, K. Kolacinska, *Recent Advances in Flow Injection Analysis*, Analyst. 141 (2016) 2085–2139.
- [57] V. Cerdà, J.M. Estelal, J. Avivar, *Multicommutated flow injection analysis , multisyringe flow injection analysis , and multipumping flow systems : Theory and trends*, in: C. Ruiz-Capillas, L.M.L. Nollet (Eds.),

- Flow Inject. Anal. Food Addit., CRC Press, Boca Raton, **2015**: pp. 79–99.
- [58] V. Cerdà, L. Ferrer, J. Avivar, A. Cerdà, *Evolution and description of the principal flow techniques*, in: *Flow Anal. A Pract. Guid.*, Elsevier Science, **2014**.
- [59] V. Cerda, *Multisyringe flow injection analysis, a young and promising flow technique*, *J. Flow Inject. Anal.* 20 (**2003**) 203–206.
- [60] E. Becerra, A. Cladera, V. Cerdà, *Design of a very versatile software program for automating analytical methods*, *Lab. Robot. Autom.* 11 (**1999**) 131–140.
- [61] M. Miró, V. Cerdà, J.M. Estela, *Multisyringe flow injection analysis: Characterization and applications*, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 21 (**2002**) 199–210.
- [62] V. Cerdà, L. Ferrer, L.A. Portugal, C.T. de Souza, S.L.C. Ferreira, *Multisyringe flow injection analysis in spectroanalytical techniques – A review*, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 98 (**2018**) 1–18.
- [63] W. Frenzel, I.D. McKelvie, *Chapter 12 Photometry*, *Compr. Anal. Chem.* 54 (**2008**) 311–342.
- [64] M. Manera, M. Miró, J.M. Estela, V. Cerdà, *Multi-syringe flow injection solid-phase extraction system for on-line simultaneous spectrophotometric determination of nitro-substituted phenol isomers*, *Anal. Chim. Acta.* 582 (**2007**) 41–49.
- [65] E.J. Llorent-Martínez, J.F. García-Reyes, P. Ortega-Barrales, A. Molina-Díaz, *Solid-phase ultraviolet sensing system for determination of methylxanthines*, *Anal. Bioanal. Chem.* 382 (**2005**) 158–163.
- [66] A. Dhaouadi, L. Monser, S. Sadok, N. Adhoum, *Flow-injection methylene blue-based spectrophotometric method for the determination of peroxide values in edible oils*, *Anal. Chim. Acta.* 576 (**2006**) 270–274.
- [67] C.E. López Pasquali, P. Fernández Hernando, J.S. Durand Alegría,

- Spectrophotometric simultaneous determination of nitrite, nitrate and ammonium in soils by flow injection analysis*, Anal. Chim. Acta. 600 (2007) 177–182.
- [68] S. Kulmala, J. Suomi, *Current status of modern analytical luminescence methods*, Anal. Chim. Acta. 500 (2003) 21–69.
- [69] P.S. Francis, C.F. Hogan, *Chapter 13 Luminescence*, Compr. Anal. Chem. 54 (2008) 343–373.
- [70] N.A. Mohamed, S. Ahmed, S.A. El Zohny, *Rapid and sensitive online determination of some selective α 1-blockers by flow injection analysis with micelle-enhanced fluorescence detection*, J. Fluoresc. 23 (2013) 1301–1311.
- [71] E.J. Llorent-Martínez, J. Jiménez-López, M.L.F. de Córdoba, P. Ortega-Barrales, A. Ruiz-Medina, *Quantitation of hydroxytyrosol in food products using a sequential injection analysis fluorescence optosensor*, J. Food Compos. Anal. 32 (2013) 99–104.
- [72] J.M. Calatayud, J.G. De Ascenção, J.R. Albert-García, *FIA-fluorimetric determination of the pesticide 3-indolyl acetic acid*, J. Fluoresc. 16 (2006) 61–67.
- [73] K. Kang, J. Park, S. Hyoung, J.Y. Oh, (12) *United States Patent*, 2 (2014).
- [74] M. B. Lima, M. Insausti, C.E. Domini, M.F. Pistonesi, M.C. Ugulino De Araújo, B.S. Fernández Band, *Automatized flow-batch method for fluorescent determination of free glycerol in biodiesel samples using on-line extraction*, Talanta. 89 (2012) 21–26.
- [75] J. Jiménez-López, P. Ortega-Barrales, A. Ruiz-Medina, *A photochemically induced fluorescence based flow-through optosensor for screening of nitenpyram residues in cruciferous vegetables*, Food Addit. Contam. - Part A Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess. 35 (2018) 941–949.
- [76] J. López-Flores, M.L. Fernández-De Córdoba, A. Molina-Díaz,

- Implementation of flow-through solid phase spectroscopic transduction with photochemically induced fluorescence: Determination of thiamine*, Anal. Chim. Acta. 535 (2005) 161–168.
- [77] I. Sánchez-Barragán, J.M. Costa-Fernández, A. Sanz-Medel, M. Valledor, *Room-temperature phosphorescence (RTP) for optical sensing*, TrAC - Trends Anal. Chem. 25 (2006) 958–967.
- [78] J.M. Traviesa-Alvarez, J.M. Costa-Fernández, R. Pereiro, A. Sanz-Mede, *Direct screening of tetracyclines in water and bovine milk using room temperature phosphorescence detection*, Anal. Chim. Acta. 589 (2007) 51–58.
- [79] A. García-Campaña, W. Baeyens, X. Zhang, F. Alés, L. Gámiz, *Quimioluminiscencia: una interesante alternativa para la detección analítica en sistemas de flujo*, Ars Pharm. 42 (2001) 81–107.
- [80] J.L. López-Paz, M. Catalá-Icardo, *Analysis of Pesticides by Flow Injection Coupled with Chemiluminescent Detection: A Review*, Anal. Lett. 44 (2011) 146–175.
- [81] Z. Zhang, S. Zhang, X. Zhang, *Recent developments and applications of chemiluminescence sensors*, Anal. Chim. Acta. 541 (2005) 37–46.
- [82] C. Vakha, E. Koronkiewicz, S. Kalinowski, L. Moskvina, A. Bulatov, C. Vakh, S. Koronkiewicz, S. Kalinowski, L. Moskvina, A. Bulatov, *An automatic chemiluminescence method based on the multi-pumping flow system coupled with the fluidized reactor and direct-injection detector: Determination of uric acid in saliva samples*, Talanta. 167 (2017) 725–732.
- [83] F.J. Lara-Ortega, B. Gilbert López, M. Beneito Cambra, A. Molina-Díaz, *Multicommutated Flow Injection Analysis Using Chemiluminescence Detection (MCFIA-CL) for Olive Oil Analysis*, Food Anal. Methods. 11 (2018) 1804–1814.
- [84] E.J. Llorent-Martínez, P. Ortega-Barrales, A. Molina-Díaz,

- Chemiluminescence optosensing implemented with multicommutation: Determination of salicylic acid*, *Anal. Chim. Acta.* 580 (2006) 149–154.
- [85] A. Ruiz-Medina, E.J. Llorent-Martinez, P. Ortega-Barrales, M.L.F. De Cordova, *Lanthanide-sensitized luminescence as a promising tool in clinical analysis*, *Appl. Spectrosc. Rev.* 46 (2011) 561–580.
- [86] A. Gómez-Hens, M.P. Aguilar-Caballos, *Terbium-sensitized luminescence: A selective and versatile analytical approach*, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 21 (2002) 131–141.
- [87] S. Armenta, S. Garrigues, M. de la Guardia, *Chapter 15 Vibrational Spectrometry*, Elsevier Masson SAS, 2008.
- [88] D. Pérez-Palacios, S. Armenta, B. Lendl, *Flow-through Fourier transform infrared sensor for total hydrocarbons determination in water*, *Appl. Spectrosc.* 63 (2009) 1015–1021.
- [89] P. Ortega-Barrales, M.J. Ayora-Cañada, A. Molina-Díaz, S. Garrigues, M. De La Guardia, *Solid phase Fourier transform near infrared spectroscopy*, *Analyst.* 124 (1999) 579–582.
- [90] M.J.A. Cañada, A.R. Medina, B. Lendl, *Determination of free fatty acids in edible oils by continuous-flow analysis with FT-IR spectroscopic detection*, *Appl. Spectrosc.* 55 (2001) 356–360.
- [91] M. Gallignani, M.D.R. Brunetto, *Infrared detection in flow analysis - Developments and trends (review)*, *Talanta.* 64 (2004) 1127–1146.
- [92] M.J. Ruedas-Rama, M. López-Sánchez, A. Ruiz-Medina, A. Molina-Díaz, M.J. Ayora-Cañada, *Flow-through sensor with Fourier transform Raman detection for determination of sulfonamides*, *Analyst.* 130 (2005) 1617–1623.
- [93] M. López-Pastor, A. Domínguez-Vidal, M.J. Ayora-Cañada, T. Laurell, M. Valcárcel, B. Lendl, *Containerless reaction monitoring in ionic liquids by means of Raman microspectroscopy*, *Lab Chip.* 7 (2007) 126–132.

- [94] S. Lee, J. Choi, L. Chen, B. Park, J.B. Kyong, G.H. Seong, J. Choo, Y. Lee, K.H. Shin, E.K. Lee, S.W. Joo, K.H. Lee, *Fast and sensitive trace analysis of malachite green using a surface-enhanced Raman microfluidic sensor*, *Anal. Chim. Acta.* 590 (2007) 139–144.
- [95] M.J. Ruedas-Rama, A. Domínguez-Vidal, S. Radel, B. Lendl, *Ultrasonic trapping of microparticles in suspension and reaction monitoring using Raman microspectroscopy*, *Anal. Chem.* 79 (2007) 7853–7857.
- [96] E.H. Hansen, M. Miró, *Chapter 14 Atomic Spectroscopic Detection*, *Compr. Anal. Chem.* 54 (2008) 375–405.
- [97] M. Miró, E.H. Hansen, *On-line sample processing involving microextraction techniques as a front-end to atomic spectrometric detection for trace metal assays: A review*, *Anal. Chim. Acta.* 782 (2013) 1–11.
- [98] Y.L. Yu, Y. Jiang, M.L. Chen, J.H. Wang, *Lab-on-valve in the miniaturization of analytical systems and sample processing for metal analysis*, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 30 (2011) 1649–1658.
- [99] A.N. Anthemidis, M. Miró, *Recent developments in flow injection/sequential injection liquid-liquid extraction for atomic spectrometric determination of metals and metalloids*, *Appl. Spectrosc. Rev.* 44 (2009) 140–167.
- [100] D. Pairoh, K. Chaiendoo, W. Ngeontae, R. Burakham, *Sequential Injection Analysis of Fe(II) in Supplement Samples Using Silver Nanoclusters as Optical Sensor*, *Curr. Anal. Chem.* 12 (2016) 612–619.
- [101] S. Sadeghi, V. Ashoori, *Sequential determination of iron species in food samples by new task specific ionic liquid based: In situ dispersive liquid-liquid microextraction prior to flame atomic absorption spectrometry*, *Anal. Methods.* 8 (2016) 5031–5038.
- [102] E. Rossi, M.I. Errea, M.M.F. de Cortalezzi, J. Stripeikis, *Selective determination of Cr (VI) by on-line solid phase extraction FI-SPE-FAAS*

- using an ion exchanger resin as sorbent: An improvement treatment of the analytical signal*, *Microchem. J.* 130 (2017) 88–92.
- [103] F.A.C. Suquila, C.R.T. Tarley, *Performance of restricted access copper-imprinted poly(allylthiourea) in an on-line preconcentration and sample clean-up FIA-FAAS system for copper determination in milk samples*, *Talanta*. 202 (2019) 460–468.
- [104] J.P. Jesus, C.A. Suárez, J.R. Ferreira, M.F. Giné, *Sequential injection analysis implementing multiple standard additions for As speciation by liquid chromatography and atomic fluorescence spectrometry (SIA-HPLC-AFS)*, *Talanta*. 85 (2011) 1364–1368.
- [105] W. Zhang, Y. Qi, D. Qin, J. Liu, X. Mao, G. Chen, C. Wei, Y. Qian, *Determination of inorganic arsenic in algae using bromine halogenation and on-line nonpolar solid phase extraction followed by hydride generation atomic fluorescence spectrometry*, *Talanta*. 170 (2017) 152–157.
- [106] P. Holdship, P. Bonnard, D. Price, P. Watson, *Micro flow injection ICP-MS analysis of high matrix samples: An investigation of its capability to measure trace elements in iron meteorites*, *J. Anal. At. Spectrom.* 33 (2018) 1941–1953.
- [107] A. Ivaska, *Chapter 16 Electrochemical Detection*, Elsevier Masson SAS, 2008.
- [108] R. Chaghi, L.C. de Ménorval, C. Charnay, G. Derrien, J. Zajac, *Interactions of phenol with cationic micelles of hexadecyltrimethylammonium bromide studied by titration calorimetry, conductimetry, and ¹H NMR in the range of low additive and surfactant concentrations*, *J. Colloid Interface Sci.* 326 (2008) 227–234.
- [109] G. Altioikka, N.Ö. Can, H.Y. Aboul-Enein, *Determination of Amoxicillin by Flow Injection Analysis using UV-Detection, Potentiometry, and*

- Conductometry in Pharmaceutical Preparations*, J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol. 30 (2007) 1333–1341.
- [110] A. Calvo-López, M. Puyol, J.M. Casalta, J. Alonso-Chamarro, *Multi-parametric polymer-based potentiometric analytical microsystem for future manned space missions*, Anal. Chim. Acta. 995 (2017) 77–84.
- [111] N.T. Abdel-Ghani, S.H. Hussein, *Flow injection potentiometric determination of Chlorphenoxamine Hydrochloride*, J. Appl. Electrochem. 40 (2010) 2077–2090.
- [112] L.G. Shaidarova, A. V. Gedmina, M.L. Artamonova, I.A. Chelnokova, H.C. Budnikov, *Voltammetry determination of dopamine by the electrocatalytic response of an electrode modified by a polyaniline film with an inclusion of copper(II) tetrasulfophthalocyanine*, J. Anal. Chem. 68 (2013) 516–524.
- [113] D. Baval, H. Dejmikova, M. Scampicchio, J. Zima, J. Barek, *Combination of Flow Injection Analysis and Fast Scan Differential Pulse Voltammetry for the Determination of Antioxidants*, Electroanalysis. 29 (2017) 182–187.
- [114] L. V. Faria, A.P. Lima, F.M. Araújo, T.P. Lisboa, M.A.C. Matos, R.A.A. Munoz, R.C. Matos, *High-throughput amperometric determination of tetracycline residues in milk and quality control of pharmaceutical formulations: Flow-injection: Versus batch-injection analysis*, Anal. Methods. 11 (2019) 5328–5336.
- [115] M.D. Zavolskova, V.N. Nikitina, E.D. Maksimova, E.E. Karyakina, A.A. Karyakin, *Constant Potential Amperometric Flow-Injection Analysis of Ions and Neutral Molecules Transduced by Electroactive (Conductive) Polymers*, Anal. Chem. 91 (2019) 7495–7499.
- [116] N. Nontawong, M. Amatongchai, S. Thimoonnee, S. Laosing, P. Jarujamrus, C. Karuwan, S. Chairam, *Novel amperometric flow-injection analysis of creatinine using a molecularly-imprinted polymer coated*

- copper oxide nanoparticle-modified carbon-paste-electrode*, J. Pharm. Biomed. Anal. 175 (2019) 112770.
- [117] F. Sassa, H. Laghzali, J. Fukuda, H. Suzuki, *Coulometric detection of components in liquid plugs by microfabricated flow channel and electrode structures*, Anal. Chem. 82 (2010) 8725–8732.
- [118] M. Kasuno, K. Fujimoto, Y. Kakitani, T. Matsushita, S. Kihara, *Precise coulometric determination of redox inert anions based on electrolysis at the aqueous/organic solution interface*, J. Electroanal. Chem. 651 (2011) 111–117.
- [119] S. Mitra, *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry Chemical Analysis*, John Wiley & Sons, Hoboken, 2003.
- [120] V.R. Meyer, R.E. Majors, *Minimizing the effect of sample preparation on measurement uncertainty*, LC-GC North Am. 20 (2002) 106–112.
- [121] V. Cerdà, J.M. Estela, *Chapter 6 On-Line Sample Pretreatment: Dissolution and Digestion*, Compr. Anal. Chem. 54 (2008) 129–158.
- [122] M. Alexovič, B. Horstkotte, I. Šrámková, P. Solich, J. Sabo, *Automation of dispersive liquid–liquid microextraction and related techniques. Approaches based on flow, batch, flow-batch and in-syringe modes*, TrAC - Trends Anal. Chem. 86 (2017) 39–55.
- [123] P.H.G.D. Diniz, L.F. de Almeida, D.P. Harding, M.C.U. De Araújo, *Flow-batch analysis*, TrAC - Trends Anal. Chem. 35 (2012) 39–49.
- [124] C.I.C. Silvestre, J.L.M. Santos, J.L.F.C. Lima, E.A.G. Zagatto, *Liquid-liquid extraction in flow analysis: A critical review*, Anal. Chim. Acta. 652 (2009) 54–65.
- [125] M. Alexovič, B. Horstkotte, P. Solich, J. Sabo, *Automation of static and dynamic non-dispersive liquid phase microextraction. Part 1: Approaches based on extractant drop-, plug-, film- and microflow-formation*, Anal. Chim. Acta. 906 (2016) 22–40.
- [126] M. Alexovič, B. Horstkotte, P. Solich, J. Sabo, *Automation of static and*

- dynamic non-dispersive liquid phase microextraction. Part 2: Approaches based on impregnated membranes and porous supports*, Anal. Chim. Acta. 907 (2016) 18–30.
- [127] H. Bergamin F, J.X. Medeiros, B.F. Reis, E.A.G. Zagatto, *Solvent extraction in continuous flow injection analysis. Determination of molybdenum in plant material*, Anal. Chim. Acta. 101 (1978) 9–16.
- [128] B. Karlberg, S. Thelander, *Extraction based on the flow-injection principle. Part I. Description of the Extraction System*, Anal. Chim. Acta. 98 (1978) 1–7.
- [129] M.D. Luque de Castro, B. Álvarez-Sánchez, *Chapter 9 Membrane-Based Separation Techniques: Liquid-Liquid Extraction and Filtration*, Compr. Anal. Chem. 54 (2008) 235–264.
- [130] S. Motomizu, T. Sakai, *Chapter 7 On-Line Sample Pretreatment: Extraction and Preconcentration*, Elsevier, 2008.
- [131] C.F. Nascimento, F.R.P. Rocha, *Spectrofluorimetric determination of bisphenol A in tap waters by exploiting liquid-liquid microextraction in a sequential injection system*, Microchem. J. 137 (2018) 429–434.
- [132] Y. Fajardo, E. Gómez, F. Garcias, V. Cerdà, M. Casas, *Multisyringe flow injection analysis of stable and radioactive yttrium in water and biological samples*, Anal. Chim. Acta. 539 (2005) 189–194.
- [133] T. Aydan, M. Takeuchi, H. Tanaka, *Spectrophotometric Determination of Anionic Surfactant Based on Ion-pair Formation with Methylene Blue in Reversed Flow Injection Mode*, J. Flow Inject. Anal. 26 (2009) 133–137.
- [134] A. Alonso, M.J. Almendral, M.J. Porras, Y. Curto, *Flow-injection solvent extraction without phase separation. Fluorimetric determination of thiamine by the thiochrome method*, J. Pharm. Biomed. Anal. 42 (2006) 171–177.
- [135] A.C. Pereira, F.R.P. Rocha, *Liquid-liquid microextraction in a*

- multicommuted flow system for direct spectrophotometric determination of iodine value in biodiesel*, Anal. Chim. Acta. 829 (2014) 28–32.
- [136] A.C. Pereira, F.R.P. Rocha, *A multicommuted flow system with liquid-liquid microextraction for determination of anionic surfactants in freshwaters*, Anal. Methods. 5 (2013) 2104–2109.
- [137] E. Palacio-Barco, F. Robert-Peillard, J.L. Boudenne, B. Coulomb, *On-line analysis of volatile fatty acids in anaerobic treatment processes*, Anal. Chim. Acta. 668 (2010) 74–79.
- [138] J. Škrliková, V. Andruch, H. Sklenářová, P. Chocholouš, P. Solich, I.S. Balogh, *A novel dual-valve sequential injection manifold (DV-SIA) for automated liquid-liquid extraction. Application for the determination of picric acid*, Anal. Chim. Acta. 666 (2010) 55–61.
- [139] C. A. Lucy, K. K.-C. Yeung, *Solvent Extraction-Flow Injection without Phase Separation through the Use of the Differential Flow Velocities within the Segmented Flow*, Anal. Chem. 66 (1994) 2220–2225.
- [140] L. Nord, B. Karlberg, *Extraction based on the flow-injection principle : Part 6. Film formation and dispersion in liquid—liquid segmented flow extraction systems*, Anal. Chim. Acta. 164 (1984) 233–249.
- [141] M. Miró, A. Cladera, J.M. Estela, V. Cerdà, *Dual wetting-film multi-syringe flow injection analysis extraction: Application to the simultaneous determination of nitrophenols*, Anal. Chim. Acta. 438 (2001) 103–116.
- [142] Y. Yamini, M. Rezazadeh, S. Seidi, *Liquid-phase microextraction – The different principles and configurations*, TrAC - Trends Anal. Chem. 112 (2019) 264–272.
- [143] L. Wang, Z. Wang, H. Zhang, X. Li, H. Zhang, *Ultrasonic nebulization extraction coupled with headspace single drop microextraction and gas chromatography–mass spectrometry for analysis of the essential oil in*

- Cuminum cyminum* L., Anal. Chim. Acta. 647 (2009) 72–77.
- [144] H. Bagheri, M. Dehghan, A. Es'Haghi, M. Naderi, *A conically fixed position single drop microextraction method for isolation of aryloxyphenoxypropionate herbicides from aquatic media*, Anal. Methods. 5 (2013) 4846–4851.
- [145] S. Jahan, Q. Zhang, A. Pratush, H. Xie, H. Xiao, L. Fan, C. Cao, *In-Vial Temperature Gradient Headspace Single Drop Microextraction Designed by Multiphysics Simulation*, Anal. Chem. 88 (2016) 10490–10498.
- [146] B. Zhang, F. Luo, Y. Guo, J. Li, D. Xiao, M.M.F. Choi, *A novel droplet sensor based on liquid-phase microextraction for on-line aluminum analysis*, Anal. Methods. 3 (2011) 2273–2278.
- [147] F. Pena, I. Lavilla, C. Bendicho, *Immersed single-drop microextraction interfaced with sequential injection analysis for determination of Cr(VI) in natural waters by electrothermal-atomic absorption spectrometry*, Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc. 63 (2008) 498–503.
- [148] A.N. Anthemidis, I.S.I. Adam, *Development of on-line single-drop microextraction sequential injection system for electrothermal atomic absorption spectrometric determination of trace metals*, Anal. Chim. Acta. 632 (2009) 216–220.
- [149] A. Rios, A. Escarpa, B. Simonet, *Liquid Phase Microextraction (LPME) Techniques*, in: John Wiley & Sons Ltd (Ed.), Miniaturization Anal. Syst. Princ. Des. Appl., 2009: pp. 93–138.
- [150] A.R.T.S. Araujo, M.L.M.F.S. Saraiva, J.L.F.C. Lima, M.G.A. Korn, *Flow methodology for methanol determination in biodiesel exploiting membrane-based extraction*, Anal. Chim. Acta. 613 (2008) 177–183.
- [151] E. Luque-Pérez, A. Ríos, M. Valcárcel, L.G. Danielsson, F. Ingman, *Spectrophotometric flow injection determination of caffeine in solid and slurry coffee and tea samples using supported liquid membranes*,

- Lab. Autom. Inf. Manag. 34 (1999) 131–142.
- [152] J.F. Liu, J.B. Chao, G. Bin Jiang, *Continuous flow liquid membrane extraction: A novel automatic trace-enrichment technique based on continuous flow liquid-liquid extraction combined with supported liquid membrane*, Anal. Chim. Acta. 455 (2002) 93–101.
- [153] J. Doležal, C. Moreno, A. Hrdlička, M. Valiente, *Selective transport of lanthanides through supported liquid membranes containing non-selective extractant, di-(2-ethylhexyl)phosphoric acid, as a carrier*, J. Memb. Sci. 168 (2000) 175–181.
- [154] A. V. Bulatov, D. V. Goncharova, L.N. Moskvina, *Flow-injection photometric determination of mercaptans in light oil products with chromatomembrane extraction*, J. Anal. Chem. 61 (2006) 801–803.
- [155] A.L. Moskvina, A. V. Mozhukhin, E.A. Mukhina, L.N. Moskvina, *Flow-injection photometric determination of the phenol index of natural waters in the presence of humic acids*, J. Anal. Chem. 60 (2005) 70–74.
- [156] A. Esrafil, Y. Yamini, M. Ghambarian, B. Ebrahimpour, *Automated preconcentration and analysis of organic compounds by on-line hollow fiber liquid-phase microextraction-high performance liquid chromatography*, J. Chromatogr. A. 1262 (2012) 27–33.
- [157] S. Nitiyanontakit, P. Varanusupakul, M. Miró, *Hybrid flow analyzer for automatic hollow-fiber-assisted ionic liquid-based liquid-phase microextraction with in-line membrane regeneration*, Anal. Bioanal. Chem. 405 (2013) 3279–3288.
- [158] G. Ouyang, J. Pawliszyn, *Kinetic Calibration for Automated Hollow Fiber-Protected Liquid-Phase Microextraction*, Anal. Chem. 78 (2006) 5783–5788.
- [159] E. Thordarson, S. Pálmarisdóttir, L. Mathiasson, J.Å. Jönsson, *Sample preparation using a miniaturized supported liquid membrane device connected on-line to packed capillary liquid chromatography*, Anal.

- Chem. 68 (1996) 2559–2563.
- [160] A.N. Anthemidis, K.-I.G. Ioannou, *Recent developments in homogeneous and dispersive liquid–liquid extraction for inorganic elements determination. A review*, Talanta. 80 (2009) 413–421.
- [161] K. Cherkashina, C. Vakh, S. Lebedinets, A. Pochivalov, L. Moskvina, A. Lezov, A. Bulatov, *An automated salting-out assisted liquid-liquid microextraction approach using 1-octylamine: On-line separation of tetracycline in urine samples followed by HPLC-UV determination*, Talanta. 184 (2018) 122–127.
- [162] L. Nugbienyo, Y. Malinina, S. Garmonov, M. Kamencev, I. Salahov, V. Andruch, L. Moskvina, A. Bulatov, *Automated sugaring-out liquid-liquid extraction based on flow system coupled with HPLC-UV for the determination of procainamide in urine*, Talanta. 167 (2017) 709–713.
- [163] A. Shishov, N. Volodina, D. Nechaeva, S. Gagarinova, A. Bulatov, *An automated homogeneous liquid-liquid microextraction based on deep eutectic solvent for the HPLC-UV determination of caffeine in beverages*, Microchem. J. 144 (2019) 469–473.
- [164] J.R. Vanderveen, J. Durelle, P.G. Jessop, *Design and evaluation of switchable-hydrophilicity solvents*, Green Chem. 16 (2014) 1187–1197.
- [165] M. Rezaee, Y. Assadi, M.-R. Milani Hosseini, E. Aghaee, F. Ahmadi, S. Berijani, *Determination of organic compounds in water using dispersive liquid–liquid microextraction*, J. Chromatogr. A. 1116 (2006) 1–9.
- [166] F.R. Mansour, N.D. Danielson, *Solvent-terminated dispersive liquid-liquid microextraction: a tutorial*, Anal. Chim. Acta. 1016 (2018) 1–11.
- [167] A.N. Anthemidis, K.-I.G. Ioannou, *On-line sequential injection dispersive liquid–liquid microextraction system for flame atomic absorption spectrometric determination of copper and lead in water samples*, Talanta. 79 (2009) 86–91.
- [168] A.N. Anthemidis, K.I.G. Ioannou, *Development of a sequential injection*

- dispersive liquid-liquid microextraction system for electrothermal atomic absorption spectrometry by using a hydrophobic sorbent material: Determination of lead and cadmium in natural waters*, Anal. Chim. Acta. 668 (2010) 35–40.
- [169] L. Guo, H.K. Lee, *Automated Dispersive Liquid – Liquid Microextraction – Gas Chromatography – Mass Spectrometry*, Anal. Chem. 86 (2014) 3743–3749.
- [170] B. Ebrahimpour, Y. Yamini, M. Rezazadeh, *A sensitive emulsification liquid phase microextraction coupled with on-line phase separation followed by HPLC for trace determination of sulfonamides in water samples*, Environ. Monit. Assess. 187 (2015).
- [171] B. Ebrahimpour, Y. Yamini, A. Esrafil, *Emulsification liquid phase microextraction followed by on-line phase separation coupled to high performance liquid chromatography*, Anal. Chim. Acta. 751 (2012) 79–85.
- [172] L. Guo, S. Tan, X. Li, H.K. Lee, *Fast automated dual-syringe based dispersive liquid-liquid microextraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental water samples*, J. Chromatogr. A. 1438 (2016) 1–9.
- [173] X. Wang, G. Xu, P. Chen, Y. Sun, X. Yao, Y. Lv, W. Guo, G. Wang, *Fully-automated magnetic stirring-assisted lab-in-syringe dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of arsenic species in rice samples*, RSC Adv. 8 (2018) 16858–16865.
- [174] G. Leng, Q. Hu, W.F. He, Z. Liu, W.J. Chen, W.B. Xu, Q.H. Yang, J. Sun, *A simple field method for the determination of sulfite in natural waters: Based on automated dispersive liquid-liquid microextraction coupled with ultraviolet-visible spectrophotometry*, J. Chromatogr. A. 1584 (2019) 72–79.

- [175] M. Alexovič, V. Andruch, I.S. Balogh, J. Šandrejová, *A single-valve sequential injection manifold (SV-SIA) for automation of air-assisted liquid-phase microextraction: Stopped flow spectrophotometric determination of chromium(vi)*, Anal. Methods. 5 (2013) 2497–2502.
- [176] K. Medinskaia, C. Vakh, D. Aseeva, V. Andruch, L. Moskvina, A. Bulatov, *A fully automated effervescence assisted dispersive liquid-liquid microextraction based on a stepwise injection system. Determination of antipyrine in saliva samples*, Anal. Chim. Acta. 902 (2016) 129–134.
- [177] M. Alexovič, M. Wiecek, J. Kozak, P. Kościelniak, I.S. Balogh, V. Andruch, *An automatic, vigorous-injection assisted dispersive liquid-liquid microextraction technique for stopped-flow spectrophotometric detection of boron*, Talanta. 133 (2015) 127–133.
- [178] V. Andruch, C.C. Acebal, J. Škrliková, H. Sklenářová, P. Solich, I.S. Balogh, F. Billes, L. Kocúrová, *Automated on-line dispersive liquid-liquid microextraction based on a sequential injection system*, Microchem. J. 100 (2012) 77–82.
- [179] R. Suárez, B. Horstkotte, V. Cerdà, *In-syringe magnetic stirring-assisted dispersive liquid-liquid microextraction for automation and downscaling of methylene blue active substances assay*, Talanta. 130 (2014) 555–560.
- [180] A. González, J. Avivar, V. Cerdà, *Determination of priority phenolic pollutants exploiting an in-syringe dispersive liquid-liquid microextraction-multisyringe chromatography system*, Anal. Bioanal. Chem. 407 (2015) 2013–2022.
- [181] J. Jakmunee, L. Patimapornlert, S. Suteerapataranon, N. Lenghor, K. Grudpan, *Sequential injection with lab-at-valve (LAV) approach for potentiometric determination of chloride*, Talanta. 65 (2005) 789–793.
- [182] F.R.P. Rocha, A.D. Batista, W.R. Melchert, E.A.G. Zagatto, *Solid-phase extractions in flow analysis*, An. Acad. Bras. Cienc. 90 (2018) 803–824.

- [183] J. Pereira, J. Gonçalves, V. Alves, J.S. Câmara, *Microextraction using packed sorbent as an effective and high-throughput sample extraction technique: Recent applications and future trends.*, *Sample Prep.* 1 (2013).
- [184] M.E. Salinas-Vargas, M.P. Cañizares-Macías, *On-line solid-phase extraction using a C18 minicolumn coupled to a flow injection system for determination of caffeine in green and roasted coffee beans*, *Food Chem.* 147 (2014) 182–188.
- [185] C.C. Acebal, M. Grünhut, I. Šrámková, P. Chocholouš, A.G. Lista, H. Sklenářová, P. Solich, B.S. Fernández Band, *Application of a fully integrated photodegradation-detection flow-batch analysis system with an on-line preconcentration step for the determination of metsulfuron methyl in water samples*, *Talanta.* 129 (2014) 233–240.
- [186] A. Jakubus, M. Paszkiewicz, P. Stepnowski, *Carbon Nanotubes Application in the Extraction Techniques of Pesticides : A Review*, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 47 (2017) 76–91.
- [187] C.C. Acebal, M. Grünhut, N.E. Llamas, M. Insausti, L. Zelená, H. Sklenářová, P. Solich, B.S.F. Band, *An integrated on-line method for the preconcentration and simultaneous determination of metsulfuron methyl and chlorsulfuron using oxidized carbon nanotubes and second order fluorescent data*, *Microchem. J.* 129 (2016) 90–97.
- [188] C. Herrero-Latorre, J. Barciela-García, S. García-Martín, R.M. Peña-Crecente, *Analytica Chimica Acta Graphene and carbon nanotubes as solid phase extraction sorbents for the speciation of chromium : A review*, *Anal. Chim. Acta.* 1002 (2018) 1–17.
- [189] A. Speltini, A. Scalabrini, F. Maraschi, M. Sturini, A. Profumo, *Newest applications of molecularly imprinted polymers for extraction of contaminants from environmental and food matrices: A review*, *Anal. Chim. Acta.* 974 (2017) 1–26.

- [190] A. Martín-Esteban, *Recent molecularly imprinted polymer-based sample preparation techniques in environmental analysis*, Trends Environ. Anal. Chem. 9 (2016) 8–14.
- [191] Á. Ríos, M. Zougagh, *Recent advances in magnetic nanomaterials for improving analytical processes*, TrAC - Trends Anal. Chem. 84 (2016) 72–83.
- [192] L. Okenicová, M. Žemberyová, S. Procházková, *Biosorbents for solid-phase extraction of toxic elements in waters*, Environ. Chem. Lett. 14 (2016) 67–77.
- [193] L.S.G. Teixeira, V.A. Lemos, L.M. Coelho, F.R.P. Rocha, *Applications of biosorbents in atomic spectrometry*, Appl. Spectrosc. Rev. 51 (2016) 36–72.
- [194] C. Calderilla, F. Maya, L.O. Leal, V. Cerdà, *Recent advances in flow-based automated solid-phase extraction*, TrAC - Trends Anal. Chem. 108 (2018) 370–380.
- [195] G. Giakisikli, P. Zachariadis, I. Kila, N. Teshima, A. Anthemidis, *Flow injection solid phase extraction for trace metal determination using a chelating resin and flame atomic absorption spectrometry detection*, Anal. Lett. 49 (2016) 929–942.
- [196] A. Cervantes, R. Rodríguez, L. Ferrer, V. Cerdà, L.O. Leal, *Automatic solid phase extraction of cadmium exploiting a multicommutated flow system previous ICP-MS detection: Application to tobacco samples*, Microchem. J. 132 (2017) 107–111.
- [197] V.N. Alves, N.M.M. Coelho, *Selective extraction and preconcentration of chromium using Moringa oleifera husks as biosorbent and flame atomic absorption spectrometry*, Microchem. J. 109 (2013) 16–22.
- [198] J.L. Flores, M.L. Fernandez de Cordova, A. Molina Diaz, *Flow-through optosensor combined with photochemically induced fluorescence for simultaneous determination of binary mixtures of sulfonamides in*

- pharmaceuticals, milk and urine*, Anal. Chim. Acta. 600 (2007) 164–171.
- [199] B. Gilbert-López, E.J. Llorent-Martínez, P. Ortega-Barrales, A. Molina-Díaz, *Development of a multicommutated flow-through optosensor for the determination of a ternary pharmaceutical mixture*, J. Pharm. Biomed. Anal. 43 (2007) 515–521.
- [200] P. Ortega Barrales, A. Dominguez Vidal, M.L. Fernández de Córdova, A. Molina Díaz, *Simultaneous determination of thiamine and pyridoxine in pharmaceuticals by using a single flow-through biparameter sensor*, J. Pharm. Biomed. Anal. 25 (2001) 619–630.
- [201] E.J. Llorent-Martínez, M.L. Fernández-de Córdova, P. Ortega-Barrales, A. Ruiz-Medina, *Analysis of agroalimentary and environmental contaminants using flow-through chemical optosensors*, Appl. Spectrosc. Rev. 50 (2015) 527–556.
- [202] P. Chocholouš, D. Šatínský, P. Solich, *New generation of sequential injection chromatography: Great enhancement of capabilities of separation using flow analysis*, Talanta. 204 (2019) 272–277.
- [203] J.R. Santos, A.O.S.S. Rangel, *Development of a chromatographic low pressure flow injection system: Application to the analysis of methylxanthines in coffee*, Anal. Chim. Acta. 715 (2012) 57–63.
- [204] H.M. Oliveira, M.A. Segundo, J.L.F.C. Lima, V. Cerdà, *Multisyringe flow injection system for solid-phase extraction coupled to liquid chromatography using monolithic column for screening of phenolic pollutants*, Talanta. 77 (2009) 1466–1472.
- [205] H.M. González-San Miguel, M. Fernández, J.M. Estela, V. Cerdà, *Contribution of multi-commuted flow analysis combined with monolithic columns to low-pressure, high-performance chromatography*, TrAC - Trends Anal. Chem. 28 (2009) 336–346.
- [206] C. L. Arthur, J. Pawliszyn, *Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers*, Anal. Chem. 62 (1990) 2145–

- 2148.
- [207] J. Płotka-Wasyłka, N. Szczepańska, M. de la Guardia, J. Namieśnik, *Miniaturized solid-phase extraction techniques*, TrAC - Trends Anal. Chem. 73 (2015) 19–38.
- [208] Ó. Castro, L. Trabalón, B. Schilling, F. Borrull, E. Pocurull, *Solid phase microextraction Arrow for the determination of synthetic musk fragrances in fish samples*, J. Chromatogr. A. 1591 (2020) 55–61.
- [209] W. Wang, Z. Li, X. Zhang, S., Yang, X. Zang, C. Wang, Z. Wang, *Triazine-based porous organic framework as adsorbent for solid-phase microextraction of some organochlorine pesticides*, J. Chromatogr. A. 1602 (2020) 83–90.
- [210] S. Risticvic, *Solid-Phase Microextraction*, Elsevier, 2012.
- [211] M.E. Costa Queiroz, I. Donizeti de Souza, C. Marchioni, *Current advances and applications of in-tube solid-phase microextraction*, TrAC - Trends Anal. Chem. 111 (2019) 261–278.
- [212] D.A. Soares da Silva Burato, J., Vargas Medina, A.L. de Toffoli, F. Vasconcelos Soares Maciel, E. Mauro Lanças, *Recent advances and trends in miniaturized sample preparation techniques*, J. Sep. Sci. 43 (2020) 202–225.
- [213] M. Abdel-Rehim, *New trend in sample preparation: On-line microextraction in packed syringe for liquid and gas chromatography applications I. Determination of local anaesthetics in human plasma samples using gas chromatography-mass spectrometry*, J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 801 (2004) 317–321.
- [214] D.H.Â. Florez, H.L. de Oliveira, K.B. Borges, *Polythiophene as highly efficient sorbent for microextraction in packed sorbent for determination of steroids from bovine milk samples*, Microchem. J. 153 (2020) 104521.
- [215] J. Peña, A.M. Casas-Ferreira, M. Morales-Tenorio, B. Moreno-Cordero,

- J.L. Pérez-Pavón, *Determination of polyamines and related compounds in saliva via in situ derivatization and microextraction by packed sorbents coupled to GC-MS*, J. Chromatogr. B. 1129 (2019) 121821.
- [216] T. Rosado, M. Barroso, D.N. Vieira, E. Gallardo, *Determination of Selected Opiates in Hair Samples Using Microextraction by Packed Sorbent: A New Approach for Sample Clean-up*, J. Anal. Toxicol. 43 (2019) 465–476.
- [217] C. Vakh, M. Alaboud, S. Lebedinets, D. Korolev, V. Postnov, L. Moskvin, O. Osmolovskaya, A. Bulatov, *An automated magnetic dispersive micro-solid phase extraction in a fluidized reactor for the determination of fluoroquinolones in baby food samples*, Anal. Chim. Acta. 1001 (2018) 59–69.
- [218] Y. Jiang, P. Ma, X. Li, H. Piao, D. Li, Y. Sun, X. Wang, D. Song, *Application of metal-organic framework MIL-101(Cr) to microextraction in packed syringe for determination of triazine herbicides in corn samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*, J. Chromatogr. A. 1574 (2018) 36–41.
- [219] D. Lourenço, M. Sarraguça, G. Alves, P. Coutinho, A.R.T.S. Araujo, M. Rodrigues, *A novel HPLC method for the determination of zonisamide in human plasma using microextraction by packed sorbent optimised by experimental design*, Anal. Methods. 9 (2017) 5910–5919.
- [220] Z. Pirmohammadi, A. Bahrami, D. Nematollahi, S. Alizadeh, F. Ghorbani Shahna, R. Rahimpour, *Determination of urinary methylhippuric acids using MIL-53-NH₂ (Al) metal-organic framework in microextraction by packed sorbent followed by HPLC-UV analysis*, Biomed. Chromatogr. 34 (2020) 1–10.
- [221] E. Soleimani, A. Bahrami, A. Afkhami, F.G. Shahna, *Selective determination of mandelic acid in urine using molecularly imprinted polymer in microextraction by packed sorbent*, Arch. Toxicol. 92 (2018)

- 213–222.
- [222] M. Ghani, M. Saraji, F. Maya, V. Cerdà, *Automated multisyringe stir bar sorptive extraction using robust montmorillonite/epoxy-coated stir bars*, J. Chromatogr. A. 1445 (2016) 10–18.
- [223] G. Islas, I.S. Ibarra, P. Hernandez, J.M. Miranda, A. Cepeda, *Dispersive Solid Phase Extraction for the Analysis of Veterinary Drugs Applied to Food Samples : A Review*, Int. J. Anal. Chem. 2017 (2017) 8215271.
- [224] F.J. Anastassiades, Michelangelo; Lehotay, Steven J.; Štajnbaher, Darinka; Schenck, *Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce*, J. AOAC Int. 86 (2003) 412–431.
- [225] W.-H. Tsai, T.-C. Huang, J.-J. Huang, Y.-H. Hsue, H.-Y. Chuang, *Dispersive solid-phase microextraction method for sample extraction in the analysis of four tetracyclines in water and milk samples by high-performance liquid chromatography with diode-array detection*, J. Chromatogr. A. 1216 (2009) 2263–2269.
- [226] T.R. Dias, W.R. Melchert, M.Y. Kamogawa, F.R.P. Rocha, E.A.G. Zagatto, *Fluidized particles in flow analysis: potentialities, limitations and applications*, Talanta. 184 (2018) 325–331.
- [227] M.F.T. Ribeiro, A.C.B. Dias, J.L.M. Santos, J.L.F.C. Lima, E.A.G. Zagatto, *Fluidized beds in flow analysis: Use with ion-exchange separation for spectrophotometric determination of zinc in plant digests*, Anal. Bioanal. Chem. 384 (2006) 1019–1024.
- [228] A. Shishov, A. Zabrodin, L. Moskvina, V. Andruch, A. Bulatov, *Interfacial reaction using particle-immobilized reagents in a fluidized reactor. Determination of glycerol in biodiesel*, Anal. Chim. Acta. 914 (2016) 75–80.
- [229] M. Fujimoto, *Mikroanalyse mit Hilfe von ionenaustauschenden Harzen*.

- II. Über den Nachweis geringer Menge des Chroms mit Wasserstoffperoxyde, Bull. Chem. Soc. Jpn. 27 (1954) 347–350.
- [230] M. Fujimoto, *Mikroanalyse Mit Hilfe von Ionenaustauschenden Harzen I. Über Den Nachweis Geringer Menge Des Kobalts Mit Ammoniumrhodanid*, Bull. Chem. Soc. Jpn. 27 (1954) 48–50.
- [231] K. Yoshimura, H. Waki, S. Ohashi, *Ion-exchanger colorimetry—I: Micro determination of chromium, iron, copper and cobalt in water*, Talanta. 23 (1976) 449–454.
- [232] C.A. Heller, R.R. McBride, M.A. Ronning, *Detection of trinitrotoluene in water by fluorescent ion-exchange resins*, Anal. Chem. 49 (1977) 2251–2253.
- [233] P. Ortega-Barrales, M. L. Fernández-de Córdova, A. Molina-Díaz, *Microdetermination of Vitamin B1 in the Presence of Vitamins B2, B6, and B12 by Solid-Phase UV Spectrophotometry*, Anal. Chem. 70 (1998) 271–275.
- [234] A. Molina-Díaz, J.M. Herrador-Mariscal, M.I. Pascual-Reguera, L.F. Capitán-Vallvey, *Determination of traces of aluminium with chrome azurol S by solid-phase spectrophotometry*, Talanta. 40 (1993) 1059–1066.
- [235] A.R. Medina, M.. Fernández de Córdova, A. Molina Díaz, *A rapid and selective solid-phase UV spectrophotometric method for determination of ascorbic acid in pharmaceutical preparations and urine*, J. Pharm. Biomed. Anal. 20 (1999) 247–254.
- [236] O. Ballesteros, J.L. Vilchez, A. Navalón, *Determination of the antibacterial ofloxacin in human urine and serum samples by solid-phase spectrofluorimetry*, J. Pharm. Biomed. Anal. 30 (2002) 1103–1110.
- [237] J.L. Vilchez, M. del Olmo, R. Avidad, L.F. Capitán-Vallvey, *Determination of polycyclic aromatic hydrocarbon residues in water by synchronous*

- Solid-phase Spectrofluorimetry*, *Analyst*. 119 (1994) 1211–1214.
- [238] J. Růžička, E.H. Hansen, *Optosensing at active surfaces — a new detection principle in flow injection analysis*, *Anal. Chim. Acta*. 173 (1985) 3–21.
- [239] M. Valcarcel, M.D. Luque de Castro, *Flow-through (bio)Chemical Sensors* Plenary Lecture*, *Analyst*. 118 (1993) 593–600.
- [240] F.R.P. Rocha, I.M. Raimundo, L.S.G. Teixeira, *Direct solid-phase optical measurements in flow systems: A review*, *Anal. Lett.* 44 (2011) 528–559.
- [241] J. Ruzicka, L. Scampavia, *Peer Reviewed: From Flow Injection to Bead Injection.*, *Anal. Chem.* 71 (1999) 257A-263A.
- [242] J.F. Fernández-Sánchez, A. Segura Carretero, C. Cruces-Blanco, A. Fernández-Gutiérrez, *Highly sensitive and selective fluorescence optosensor to detect and quantify benzo[a]pyrene in water samples*, *Anal. Chim. Acta*. 506 (2004) 1–7.
- [243] J.M. Traviesa-Alvarez, I. Sánchez-Barragán, J.M. Costa-Fernández, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, *Room temperature phosphorescence optosensing of benzo[a]pyrene in water using halogenated molecularly imprinted polymers*, *Analyst*. 132 (2007) 218–223.
- [244] M.K. Amini, T. Momeni-Isfahani, J.H. Khorasani, M. Pourhossein, *Development of an optical chemical sensor based on 2-(5-bromo-2-pyridylazo) -5-(diethylamino)phenol in Nafion for determination of nickel ion*, *Talanta*. 63 (2004) 713–720.
- [245] L.S.G. Teixeira, F.R.P. Rocha, *A green analytical procedure for sensitive and selective determination of iron in water samples by flow-injection solid-phase spectrophotometry*, *Talanta*. 71 (2007) 1507–1511.
- [246] E.J. Llorent-Martínez, J. Alcántara-Durán, A. Ruiz-Medina, P. Ortega-Barrales, *Determination of Carbendazim in Food Products Using a Sequential Injection Analysis Optosensor*, *Food Anal. Methods*. 6 (2013)

- 1278–1283.
- [247] E.J. Llorent-Martínez, A. Domínguez-Vidal, P. Ortega-Barrales, A. Molina-Díaz, *Fast Determination of Salicylic Acid in Pharmaceuticals by Using a Terbium-Sensitized Luminescent SIA Optosensor*, J. Pharm. Sci. 97 (2008) 780–786.
- [248] J. Jiménez-López, E.J. Llorent-Martínez, P. Ortega-Barrales, A. Ruiz-Medina, *Multi-commutated fluorometric optosensor for the determination of citrinin in rice and red yeast rice supplements.*, Food Addit. Contam. Part A. Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess. 31 (2014) 1744–1750.
- [249] L. Molina-García, L. Fernández-De Córdova, A. Ruiz-Medina, *Analysis of Bisphenol A in milk by using a multicommutated fluorimetric sensor*, Talanta. 96 (2012) 195–201.
- [250] J. Jiménez-López, E.J. Llorent-Martínez, S. Martínez-Soliño, A. Ruiz-Medina, *Automated photochemically induced method for the quantitation of the neonicotinoid thiacloprid in lettuce*, Molecules. 24 (2019).
- [251] E.J. Llorent-Martínez, P. Ortega-Barrales, A. Molina-Díaz, *Multicommutated optosensor for the determination of pipemidic acid in biological fluids*, Anal. Biochem. 347 (2005) 330–332.
- [252] E.J. Llorent-Martínez, A. Domínguez-Vidal, P. Ortega-Barrales, M. De La Guardia, A. Molina-Díaz, *Implementation of multicommutation principle with flow-through multiptosensors*, Anal. Chim. Acta. 545 (2005) 113–118.
- [253] E.J. Llorent-Martínez, P. Ortega-Barrales, A. Molina-Díaz, *Multicommutated flow-through fluorescence optosensor for determination of furosemide and triamterene*, Anal. Bioanal. Chem. 383 (2005) 797–803.
- [254] J. López Flores, M.L. Fernández de Córdova, A. Molina Díaz,

- Simultaneous flow-injection solid-phase fluorometric determination of thiabendazole and metsulfuron methyl using photochemical derivatization*, Anal. Sci. 25 (2009) 681–686.
- [255] J.F. García Reyes, E.J. Llorent Martínez, P. Ortega Barrales, A. Molina Díaz, *Multiwavelength fluorescence based optosensor for simultaneous determination of fuberidazole, carbaryl and benomyl*, Talanta. 64 (2004) 742–749.
- [256] E.J. Llorent-Martínez, J.F. García-Reyes, P. Ortega-Barrales, A. Molina-DÍAZ, *Flow-through fluorescence-based optosensor with on-line solid-phase separation for the simultaneous determination of a ternary pesticide mixture*, J. AOAC Int. 88 (2005) 860–865.
- [257] A. Salinas-Castillo, J.F. Fernández-Sánchez, A. Segura-Carretero, A. Fernández-Gutiérrez, *A facile flow-through phosphorimetric sensing device for simultaneous determination of naptalam and its metabolite 1-naphthylamine*, Anal. Chim. Acta. 522 (2004) 19–24.
- [258] E.J. Llorent-Martínez, P. Ortega-Barrales, A. Molina-Díaz, *Multi-commutated flow-through multi-optosensing: A tool for environmental analysis*, Spectrosc. Lett. 39 (2006) 619–629.
- [259] A. Valero-Navarro, P.C. Damiani, J.F. Fernández-Sánchez, A. Segura-Carretero, A. Fernández-Gutiérrez, *Chemometric-assisted MIP-optosensing system for the simultaneous determination of monoamine naphthalenes in drinking waters*, Talanta. 78 (2009) 57–65.
- [260] A. Domínguez-Vidal, P. Ortega-Barrales, A. Molina-Díaz, *Environmental water samples analysis of pesticides by means of chemometrics combined with fluorimetric multi-optosensing*, J. Fluoresc. 17 (2007) 271–277.
- [261] I.D. McKelvie, *Chapter 4 Principles of Flow Injection Analysis*, in: Compr. Anal. Chem., Elsevier, 2008: pp. 81–109.
- [262] C. Dal Bosco, A. Gentili, *Vitamins: Clinical, Pharmaceutical, and*

- Biological Analysis*, Ref. Modul. Chem. Mol. Sci. Chem. Eng. 10 (2018).
- [263] Parlamento Europeo y del consejo, *DIRECTIVA 2002/46/CE relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros en materia de complementos alimenticios*, D. Of. Las Comunidades Eur. 183 (2002) 51–57.
- [264] Parlamento Europeo y del consejo, *REGLAMENTO (CE) No 1925/2006 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 20 de diciembre de 2006 sobre la adición de vitaminas, minerales y otras sustancias determinadas a los alimentos*, D. Of. La Unión Eur. 404 (2006) 26–38.
- [265] A. Gentili, V. Pérez-Fernández, *Vitamins / water-soluble*, *Encycl. Anal. Sci.* 10 (2019) 180–196.
- [266] D. Turck, J. Bresson, B. Burlingame, T. Dean, S. Fairweather-Tait, M. Heinonen, K.I. Hirsch-Ernst, I. Mangelsdorf, H.J. McArdle, A. Naska, G. Nowicka, K. Pentieva, Y. Sanz, A. Siani, A. Sjödin, M. Stern, D. Tomé, H. Van Loveren, M. Vinceti, P. Willatts, C. Lamberg-Allardt, H. Przyrembel, I. Tetens, J. Gudelj Rakic, S. Ioannidou, A. de Sesmaisons-Lecarré, A.C. Forss, M. Neuhäuser-Berthold, *Dietary reference values for thiamin*, *EFSA J.* 14 (2016).
- [267] B.F. Polegato, A.G. Pereira, P.S. Azevedo, N.A. Costa, L.A.M. Zornoff, S.A.R. Paiva, M.F. Minicucci, *Role of Thiamin in Health and Disease*, *Nutr. Clin. Pract.* 34 (2019) 558–564.
- [268] M. V. Chandra-Hioe, J. Arcot, M.P. Bucknall, *Thiamin: Properties and Determination*, 1st ed., Elsevier Ltd., 2015.
- [269] S. Ulusoy, M. Akçay, *Simultaneous Determination of Vitamins B1 and B2 in Food Samples by Modified Cloud Point Extraction Method and HPLC-DAD*, *Food Anal. Methods.* 11 (2018) 260–269.
- [270] K. Sasaki, H. Hatate, R. Tanaka, *Determination of 13 Vitamin B and the Related Compounds Using HPLC with UV Detection and Application to Food Supplements*, *Chromatographia.* 83 (2020) 839–851.

- [271] H.M. Pérez-Cejuela, M. Mon, J. Ferrando-Soria, E. Pardo, D. Armentano, E.F. Simó-Alfonso, J.M. Herrero-Martínez, *Bio-metal-organic frameworks for molecular recognition and sorbent extraction of hydrophilic vitamins followed by their determination using HPLC-UV*, *Microchim. Acta.* 187 (2020).
- [272] G.D.C. D'Oliveira, A.R. Chaves, C.N. Pérez, *Development and Analytical Validation of the Methodology for Vitamins in Tablets by Ultra-Performance Liquid Chromatography*, *J. Chromatogr. Sci.* 57 (2019) 881–891.
- [273] A. Gliszczynska-Świgło, I. Rybicka, *Simultaneous Determination of Caffeine and Water-Soluble Vitamins in Energy Drinks by HPLC with Photodiode Array and Fluorescence Detection*, *Food Anal. Methods.* 8 (2015) 139–146.
- [274] V. León-Ruiz, S. Vera, A. V. González-Porto, M.P. San Andrés, *Analysis of Water-Soluble Vitamins in Honey by Isocratic RP-HPLC*, *Food Anal. Methods.* 6 (2013) 488–496.
- [275] C. Liddicoat, B. Hucker, H. Liang, F. Vriesekoop, *Thiamin analysis in red wine by fluorescence reverse phase-HPLC*, *Food Chem.* 177 (2015) 325–329.
- [276] Y. Hu, H.L. Wu, X.L. Yin, H.W. Gu, R. Xiao, L.X. Xie, Z. Liu, H. Fang, L. Wang, R.Q. Yu, *Rapid and interference-free analysis of nine B-group vitamins in energy drinks using trilinear component modeling of liquid chromatography-mass spectrometry data*, *Talanta.* 180 (2018) 108–119.
- [277] H. Ren, Y. Chen, H. Wang, M. Liu, L. Ji, *Simultaneous Determination of Caffeine, Taurine and Five Water-Soluble Vitamins in Tobacco Products by HPLC–MS/MS*, *Chromatographia.* 82 (2019) 1665–1675.
- [278] K.L. Westmacott, A. Crew, O. Doran, J.P. Hart, *A novel electroanalytical approach to the measurement of B vitamins in food supplements based*

- on screen-printed carbon sensors*, *Talanta*. 181 (2018) 13–18.
- [279] T. Brezo-Borjan, Z. Stojanović, Z. Suturović, J. Kos, S. Kravić, A. Đurović, *A simple adsorptive chronopotentiometric stripping method for determination of vitamin B1 in pharmaceutical products*, *Monatshefte Fur Chemie*. 151 (2020) 285–291.
- [280] G. Icke, D. Nicol, *Automated microbiological assay of thiamin in serum and red cells*, *J. Clin. Pathol.* 47 (1994) 639–641.
- [281] T. Alizadeh, M. Akhoundian, M.R. Ganjali, *An innovative method for synthesis of imprinted polymer nanomaterial holding thiamine (vitamin B1) selective sites and its application for thiamine determination in food samples*, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1084 (2018) 166–174.
- [282] G. Daneshvar Tarigh, F. Shemirani, *Simultaneous in situ derivatization and ultrasound-assisted dispersive magnetic solid phase extraction for thiamine determination by spectrofluorimetry*, *Talanta*. 123 (2014) 71–77.
- [283] M. Zeeb, M.R. Ganjali, P. Norouzi, *Dispersive liquid-liquid microextraction followed by spectrofluorimetry as a simple and accurate technique for determination of thiamine (vitamin B1)*, *Microchim. Acta*. 168 (2010) 317–324.
- [284] T. Pérez-Ruiz, C. Martínez-Lozano, A. Sanz, A. Guillén, *Successive determination of thiamine and ascorbic acid in pharmaceuticals by flow injection analysis*, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 34 (2004) 551–557.
- [285] P. Ortega-Barrales, A. Ruiz-Medina, M.L. Fernández-de Córdoba, A. Molina-Díaz, *A flow-through solid-phase spectroscopic sensing device implemented with FIA solution measurements in the same flow cell: Determination of binary mixtures of thiamine with ascorbic acid or acetylsalicylic acid*, *Anal. Bioanal. Chem.* 373 (2002) 227–232.
- [286] https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides_en, (n.d.).

- [287] R.M. de Souza, D. Seibert, H.B. Quesada, F. de Jesus Bassetti, M.R. Fagundes-Klen, R. Bergamasco, *Occurrence, impacts and general aspects of pesticides in surface water: A review*, *Process Saf. Environ. Prot.* 135 (2020) 22–37.
- [288] Parlamento Europeo y del consejo, *Reglamento (CE) nº 1107/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 21 de octubre de 2009, relativo a la comercialización de productos fitosanitarios y por el que se derogan las Directivas 79/117/CEE y 91/414/CEE del Consejo*, D. Of. La Unión Eur. 309 (2009) 1–50.
- [289] E.P. and of the Council, *Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council of 23 February 2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin and amending Council Directive 91/414/EEC*, Off. J. Eur. Union. 66 (2010) 1–27.
- [290] [Http://www.efsa.europa.eu/en/applications/pesticides](http://www.efsa.europa.eu/en/applications/pesticides), (n.d.).
- [291] [Http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/themes/pesticides/es/#c452840](http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/themes/pesticides/es/#c452840), (n.d.).
- [292] M.A. Pearson, G.W. Miller, *Benomyl*, in: *Encycl. Toxicol. Third Ed.*, 2014: pp. 411–412.
- [293] S. Preeti, S. Aksha, J.D. Nakuleshwar, S. Nidhi, J.C. Suresh, *A Review on Toxicological Effects of Fungicides.*, *Res. J. Pharm. Biol. Chem.* 6 (2015) 348–360.
- [294] G.G. Dumancas, R.S. Hikkaduwa Koralege, E.R.E. Mojica, B.S. Murdianti, P.J. Pham, *Thiabendazole*, in: *Encycl. Toxicol. Third Ed.*, 2014: pp. 533–536.
- [295] S.E. Koshlukova, N.R. Reed, *Carbaryl*, in: *Encycl. Toxicol. Third Ed.*, 2014: pp. 668–672.
- [296] S. Mostafalou, M. Abdollahi, *Pesticides: an update of human exposure and toxicity*, *Arch. Toxicol.* 91 (2017) 549–599.

- [297] S.C. Gad, *Phenylphenol*, in: *Encycl. Toxicol. Third Ed.*, **2014**: pp. 889–892.
- [298] D. Brusick, *Analysis of genotoxicity and the carcinogenic mode of action for ortho-phenylphenol*, *Environ. Mol. Mutagen.* 45 (**2005**) 460–481.
- [299] E.F.S.A. EFSA, *Review of the existing maximum residue levels for 2-phenylphenol according to Article 12 of Regulation (EC) No 396/2005*, *EFSA J.* 15 (**2017**).
- [300] G.N. Piccirilli, G.M. Escandar, *Partial least-squares with residual bilinearization for the spectrofluorimetric determination of pesticides. A solution of the problems of inner-filter effects and matrix interferences*, *Analyst.* 131 (**2006**) 1012–1020.
- [301] M.J. Rodríguez-Cuesta, R. Boqué, F.X. Rius, D. Picón Zamora, M. Martínez Galera, A. Garrido Frenich, *Determination of carbendazim, fuberidazole and thiabendazole by three-dimensional excitation-emission matrix fluorescence and parallel factor analysis*, *Anal. Chim. Acta.* 491 (**2003**) 47–56.
- [302] Y.Y. Yuan, S.T. Wang, Q. Cheng, D.M. Kong, X.G. Che, *Simultaneous determination of carbendazim and chlorothalonil pesticide residues in peanut oil using excitation-emission matrix fluorescence coupled with three-way calibration method*, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 220 (**2019**) 2020.
- [303] J.A. Murillo Pulgarín, L.F. García Bermejo, S.B. Rodríguez, *Simultaneous Determination of 1-Naphthylacetic Acid and Thiabendazole in Strawberry Tree Berries and Citrus Fruits by Fluorescence Spectrometry*, *Food Anal. Methods.* 11 (**2018**) 394–402.
- [304] N. Altunay, D. Ülüzger, R. Gürkan, *Simple and fast spectrophotometric determination of low levels of thiabendazole residues in fruit and vegetables after pre-concentration with ionic liquid phase microextraction*, *Food Addit. Contam. - Part A Chem. Anal. Control.*

- Expo. Risk Assess. 35 (2018) 1139–1154.
- [305] W. Li, Y. Wang, L. Huang, T. Wu, H. Hu, Y. Du, *Rapid determination of trace thiabendazole in apple juice utilizing dispersive liquid-liquid microextraction combined with fluorescence spectrophotometry*, Luminescence. 30 (2015) 872–877.
- [306] N.L. Pacioni, A. V. Veglia, *Determination of carbaryl and carbofuran in fruits and tap water by β -cyclodextrin enhanced fluorimetric method*, Anal. Chim. Acta. 488 (2003) 193–202.
- [307] W.R. Melchert, F.R.P. Rocha, *A greener and highly sensitive flow-based procedure for carbaryl determination exploiting long pathlength spectrophotometry and photochemical waste degradation*, Talanta. 81 (2010) 327–333.
- [308] Y. Yang, X. Xing, T. Zou, Z. Wang, R. Zhao, P. Hong, S. Peng, X. Zhang, Y. Wang, *A novel and sensitive ratiometric fluorescence assay for carbendazim based on N-doped carbon quantum dots and gold nanocluster nanohybrid*, J. Hazard. Mater. 386 (2020) 121958.
- [309] T.M.B.F. Oliveira, F.W.P. Ribeiro, C.P. Sousa, G.R. Salazar-Banda, P. de Lima-Neto, A.N. Correia, S. Morais, *Current overview and perspectives on carbon-based (bio)sensors for carbamate pesticides electroanalysis*, TrAC - Trends Anal. Chem. 124 (2020) 115779.
- [310] A. Ruiz-Medina, E.J. Llorent-Martínez, M.L. Fernández-de Córdova, P. Ortega-Barrales, *Automated optosensor for the determination of carbaryl residues in vegetable edible oils and table olive extracts*, J. Food Compos. Anal. 26 (2012) 66–71.
- [311] E.J. Llorent-Martínez, M.L. Fernández-De Córdova, A. Ruiz-Medina, P. Ortega-Barrales, *Fluorimetric determination of thiabendazole residues in mushrooms using sequential injection analysis*, Talanta. 96 (2012) 190–194.
- [312] M. Brycht, O. Vajdle, K. Sipa, J. Robak, K. Rudnicki, J. Piechocka, A. Tasić,

- S. Skrzypek, V. Guzsvány, *B-Cyclodextrin and multiwalled carbon nanotubes modified boron-doped diamond electrode for voltammetric assay of carbendazim and its corrosion inhibition behavior on stainless steel*, *Ionics* (Kiel). 24 (2018) 923–934.
- [313] M.L. Xu, Y. Gao, X.X. Han, B. Zhao, *Detection of Pesticide Residues in Food Using Surface-Enhanced Raman Spectroscopy: A Review*, *J. Agric. Food Chem.* 65 (2017) 6719–6726.
- [314] K. Chullasat, Z. Huang, O. Bunkoed, P. Kanatharana, H.K. Lee, *Bubble-in-drop microextraction of carbamate pesticides followed by gas chromatography-mass spectrometric analysis*, *Microchem. J.* 155 (2020) 104666.
- [315] D. Anđelković, M. Branković, G. Kocić, S. Mitić, R. Pavlović, *Sorbent-excluding sample preparation method for GC–MS pesticide analysis in apple peel*, *Biomed. Chromatogr.* 34 (2020) 2020.
- [316] X. Ye, H. Shao, T. Zhou, J. Xu, X. Cao, W. Mo, *Analysis of Organochlorine Pesticides in Tomatoes Using a Modified QuEChERS Method Based on N-Doped Graphitized Carbon Coupled with GC-MS/MS*, *Food Anal. Methods.* 13 (2020) 823–832.
- [317] A. Samad, S. Akhtar, M.M. Shahid, K. Ahad, *Determination of pesticide residues in peaches by using gas chromatography and mass spectrometric detection*, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 99 (2019) 1446–1458.
- [318] G.L. Scheel, C.R. Teixeira Tarley, *Simultaneous microextraction of carbendazim, fipronil and picoxystrobin in naturally and artificial occurring water bodies by water-induced supramolecular solvent and determination by HPLC-DAD*, *J. Mol. Liq.* 297 (2020) 111897.
- [319] S. Garcia-Alonso, R.M. Perez-Pastor, *Organic Analysis of Environmental Samples Using Liquid Chromatography with Diode Array and Fluorescence Detectors: An Overview*, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 50 (2020)

- 29–49.
- [320] D. Moreno-González, J.F. Huertas-Pérez, L. Gámiz-Gracia, A.M. García-Campaña, *Determination of carbamates at trace levels in water and cucumber by capillary liquid chromatography*, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 91 (2011) 1329–1340.
- [321] O. Hazer, M. Akkik, D. Demir, Y. Turhan, *Determination of carbendazim and chlorpyrifos in selected fruits and vegetables samples using QuEChERS-HPLC-FD*, *Eurasian J. Anal. Chem.* 12 (2017) 17–30.
- [322] N.M. Valera-Tarifa, R. Santiago-Valverde, E. Hernández-Torres, J.L. Martínez-Vidal, A. Garrido-Frenich, *Development and full validation of a multiresidue method for the analysis of a wide range of pesticides in processed fruit by UHPLC-MS/MS*, *Food Chem.* 315 (2020) 126304.
- [323] H. Zhou, Y.M. Cao, S. Miao, L. Lan, M. Chen, W.T. Li, X.H. Mao, S. Ji, *Qualitative screening and quantitative determination of 569 pesticide residues in honeysuckle using ultrahigh-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-Orbitrap high resolution mass spectrometry*, *J. Chromatogr. A.* 1606 (2019) 460374.
- [324] X. Zhang, Y. Song, Q. Jia, L. Zhang, W. Zhang, P. Mu, Y. Jia, Y. Qian, J. Qiu, *Simultaneous determination of 58 pesticides and relevant metabolites in eggs with a multi-functional filter by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*, *J. Chromatogr. A.* 1593 (2019) 81–90.
- [325] A. Stachniuk, E. Fornal, *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in the Analysis of Pesticide Residues in Food*, *Food Anal. Methods.* 9 (2016) 1654–1665.
- [326] K.J. Groh, T. Backhaus, B. Carney-Almroth, B. Geueke, P.A. Inostroza, A. Lennquist, H.A. Leslie, M. Maffini, D. Slunge, L. Trasande, A. Michael Warhurst, J. Muncke, *Overview of known plastic packaging-associated chemicals and their hazards*, *Sci. Total Environ.* 651 (2018) 3253–3268.

- [327] I.S. Arvanitoyannis, K. V. Kotsanopoulos, *Migration Phenomenon in Food Packaging. Food-Package Interactions, Mechanisms, Types of Migrants, Testing and Relative Legislation-A Review*, Food Bioprocess Technol. 7 (2013) 21–36.
- [328] La Comisión Europea, *REGLAMENTO (UE) No 10/2011 de la Comisión de 14 de enero de 2011 sobre materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con alimentos*, D. Of. La Unión Eur. (2011).
- [329] H.R. Kricheldorf, S. Sun, B. Sapich, J. Stumpe, I. Chemie, A.H. Universitat, *Polymers of carbonic acid , 23a) Photoreactive cholesteric polycarbonates based on dihydroxy biphenyl*, 2210 (1997) 2197–2210.
- [330] M. Eckardt, A. Greb, T.J. Simat, *Polyphenylsulfone (PPSU) for baby bottles – a comprehensive assessment on polymer related non-intentionally added substances (NIAS)*, Food Addit. Contam. Part A. Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess. 35 (2018) 1421–1437.
- [331] J. Asrar, H. Toriumi, J. Watanabe, W.R. Krigbaum, A. Ciferr, N. Carolina, J. Preston, M. Textiles, *Thermotropic Homopolyesters . I . The Preparation Dihydroxybiphenyl*, 21 (1983) 1119–1131.
- [332] D.O. Humme, *Atlas of Plastics Additives: Analysis by Spectrometric Methods*, 2002.
- [333] T. Nishihara, J. Nishikawa, T. Kanayama, F. Dakeyama, K. Saito, M. Imagawa, S. Takatori, Y. Kitagawa, S. Hori, H. Utsumi, *Estrogenic Activities of 512 chemicals by yeast two-hybrid assay*, J. Heal. Sci. 46 (2000) 282–298.
- [334] C.M. Olsen, E.T.M. Meussen-elholm, M. Samuelsen, J.A. Holme, J.K. Hongslo, *Effects of the Environmental Oestrogens Bisphenol A , Tetrachlorobisphenol A , Tetrabromobisphenol A , 4-Hydroxybiphenyl and 4 , 4 -Dihydroxybiphenyl on Oestrogen Receptor Binding , Cell Proliferation and Regulation of Oestrogen Sensitive Proteins in th*, (2003) 180–188.

- [335] Y. Sanchis, V. Yusà, C. Coscollà, *Analytical strategies for organic food packaging contaminants*, J. Chromatogr. A. 1490 (2017) 22–46.
- [336] C. Nerin, K. Bentayeb, A. Rodriguez-Lafuente, *Sampling techniques for the determination of migrants from packaging materials in food*, in: Compr. Sampl. Sample Prep., Elsevier, 2012: pp. 357–379.
- [337] European Committee for Standardization, *Materials and articles in contact with foodstuffs - Plastics substances subject to limitation - Part 18: Determination of 1,2-dihydroxybenzene, 1,3-dihydroxybenzene, 1,4-dihydroxybenzene, 4,4'-dihydroxybenzophenone and 4,4'-dihydroxybiphenyl in food simula*, (2006).
- [338] M. Eckardt, A. Greb, T.J. Simat, *Polyphenylsulfone (PPSU) for baby bottles: a comprehensive assessment on polymer-related non-intentionally added substances (NIAS)*, Food Addit. Contam. - Part A Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess. 35 (2018) 1421–1437.

ANEXOS

Anexo 1: Contribuciones científicas

En este Anexo se recogen todas las contribuciones científicas y actividades llevadas a cabo en el transcurso de esta Tesis Doctoral.

A) Contribuciones derivadas de esta Memoria de Investigación

Publicaciones científicas

1. *Separation of a binary mixture of pesticides in fruits using a flow-through optosensor*. *Talanta*, 115 (2013), pp. 462-467
2. *A new approach for automated liquid-liquid extraction in a sequential injection manifold*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407(2) (2015) pp. 521-528.
3. *Novel sequential separation and determination of a quaternary mixture of fungicides by using an automatic fluorimetric optosensor*. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 36(2) (2019), pp. 278-288
4. *Automated on-line liquid-liquid extraction in a multisyringe flow injection analysis manifold for migration studies in food-contact materials: analysis of 4,4'-dihydroxybiphenyl*. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 37(1) (2020), pp. 174-182.

Comunicaciones a congresos

1. *SIA optosensor for the fluorimetric determination of carbendazim and ophenylphenol in fruits*. International conference on flow analysis; Thessaloniki, Grecia, septiembre 2012.
2. *A new approach for automated liquid-liquid extraction by means of a sequential injection manifold*. 18th ICFIA International Conference on Flow Injection Analysis; Porto, Portugal, septiembre 2013.
3. *SIA optosensor for the simultaneous espectrofluorimetric determination of mixtures of pesticides*. XXIV Reunión Nacional de Espectroscopia-VIII Congreso Ibérico de Espectroscopia; Logroño, España, julio 2014.
4. *Automated Liquid-liquid extraction applied to specific migration analysis*. 20th International Conference on Flow Injection Analysis and Related Techniques; Mallorca, octubre 2016.
5. *Automatización de la extracción líquido-líquido mediante un sistema multijeringa para análisis de migración*. XVI Reunión del grupo regional andaluz de la sociedad española de química analítica; Granada, octubre 2018.

B) Otras contribuciones científicas y méritos

Artículos científicos

1. *Sequential Injection Analysis of Ciclopirox Olamine Using Lanthanide-Sensitized Luminescence Detection*. *Analytical Letters*, 46 (11) (2013), pp. 1816-1825.

Otros méritos

1. Estancia de investigación en empresa. Beca de la Escuela de Doctorado de la Universidad de Jaén para una estancia de investigación en “Fundación Andaltec I+D+i” durante 3 meses (octubre-diciembre 2015).

Anexo 2: Acrónimos y abreviaturas

En este Anexo se recogen los acrónimos y abreviaturas empleados en esta Memoria de Investigación.

AFS	<i>Atomic Fluorescence Spectroscopy</i> (Espectroscopía de fluorescencia atómica)
CB	<i>Carbaryl</i> (Carbarilo)
CBZ	<i>Carbendazim</i> (Carbendazima)
CCLLE	<i>Continuous Conventional Liquid-Liquid Extraction</i> (Extracción líquido-líquido convencional en continuo)
CIA	<i>Cross Injection Analysis</i> (Análisis por Inyección Cruzada)
CNTs	<i>Carbon nanotubes</i> (Nanotubos de carbono)
DHBP	<i>4,4'-Dihydroxybiphenyl</i> (4,4'-Dihidroxibifenilo)
DI-SDME	<i>Direct immersion single-drop microextraction</i>
DI-SPME	<i>Direct inmersión Solid fase microextraction</i> (Microextracción en fase sólida por inmersión directa)
DLLME	<i>Dispersive liquid-liquid microextraction</i>
DSPE	<i>Dispersive Solid Phase Extraction</i> (Extracción en fase sólida dispersiva)
DSPME	<i>Dispersive Solid Phase Microextraction</i> (Microextracción en fase sólida dispersiva)
EC	<i>Extraction Coil</i> (Bucle de extracción)
EFSA	<i>European Food Safety Agency</i> (Agencia Europea de Seguridad Alimentaria)
ETFE	<i>Ethylene tetrafluoroethylene</i> (Etileno tetrafluoroetileno)
FAAS	<i>Flame Atomic Absorption Spectroscopy</i> (Espectrometría de absorción atómica de llama)
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i> (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura)
FBA	<i>Flow-batch analysis</i>
FEP	<i>Fluorinated ethylene propylene</i> (Copolímero etileno-propileno fluorado)
FIA	<i>Flow Injection Analysis</i> (Análisis por inyección en flujo)
FTIR	<i>Fourier-transform infrared spectroscopy</i> (Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier)
GC	<i>Gas Chromatography</i> (Cromatografía de gases)
GC-MS	<i>Gas Chromatography-Mass Spectroscopy</i> (Cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas)
HC	<i>Holding Coil</i> (Bucle de retención)
HDVB	<i>Highly cross-linked polystyrene divinylbenzene</i>

HF-LPME	<i>Hollow-fibre liquid phase microextraction</i>
HLLME	<i>Homogeneous liquid-liquid microextraction</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografía líquida de alta eficacia)
HS -SDME	<i>Head space single-drop microextraction</i>
HS-SPME	<i>Head Space Solid Phase Microextraction</i> (Microextracción en fase sólida por espacio de cabeza)
ICP-MS	<i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectroscopy</i> (Espectrometría de masas por plasma acoplado inductivamente)
IR	Infrarrojo
LIS	<i>Lab-In-Syringe</i>
LLE	<i>Liquid-Liquid Extraction</i> (Extracción líquido-líquido)
LOV	<i>Lab-On-Valve</i>
LPME	<i>Liquid Phase Microextraction</i> (Microextracción en fase líquida)
LSL	<i>Lanthanide Sensitized Luminiscence</i> (Luminiscencia sensibilizada por lantánidos)
MCFIA	<i>Multiconmuted Flow Injection Analysis</i> (Análisis por inyección en flujo multiconmutado)
MEPS	<i>Microextraction by Packed Sorbent</i> (microextracción por sorbente empaquetado)
MIPs	<i>Molecularly Imprinted Polymer</i> (Polímeros de impresión molecular)
MNPs	<i>Magnetic Nanoparticules</i> (Nanopartículas magnéticas)
MPFS	<i>Multipumping Flow Injection Analysis</i> (Análisis por inyección en flujo multibombas)
MRL	<i>Maximum Residue Limit</i> (Límite de residuo máximo)
MSFIA	<i>Multisyringe Flow Injection Analysis</i> (Análisis por inyección en flujo multijeringa)
MV	<i>Multiposition Valve</i> (Válvula Multiposición)
MWNT	<i>Multi-walled nanotubes</i> (Nanotubos de pared múltiple)
OPP	<i>Ortho-Phenylphenol</i> (orto-fenilfenol)
PC	<i>Polycarbonate</i> (Policarbonato)
PE	<i>Polyethylene</i> (Polietileno)
PEEK	<i>Polyether ether ketone</i> (Polieteretercetona)
PP	<i>Polypropylene</i> (Polipropileno)
PTFE	<i>Polytetrafluoroethylene</i> (Politetrafluoroetileno)
PVC	<i>Polyvinyl chloide</i> (Policloruro de vinilo)
SAX	<i>Strong anion exchange</i>
SBSE	<i>Stir Bar Sorptive Extraction</i> (Extracción en barras de agitación)
SC	<i>Separation Chamber</i> (Cámara de separación)
SCX	<i>Strong cation exchange</i>

SDME	<i>Single-Drop Microextraction</i>
SDVB	<i>Polystyrene-divinylbenzene copolymer</i>
SERS	<i>Surface-Enhanced Raman Spectroscopy</i> (Espectroscopía Raman sensibilizada en superficie)
SFA	<i>Segmented Flow Analysis</i> (Análisis por flujo segmentado)
SIA	<i>Secential Injection Analysis</i> (Análisis por inyección secuencial)
SIEMA	<i>Simultaneous Injection effective Mixing Analysis</i> (Análisis por Inyección Simultánea-Mezcla Efectiva)
SML	<i>Specific Migration Limit</i> (Límite de migración específico)
SP	<i>Syringe Pump</i> (Bomba de jeringa)
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i> (Extracción en fase sólida)
SPME	<i>Solid Phase Microextraction</i> (Microextracción en fase sólida)
SPS	<i>Solid Phase Spectroscopy</i> (Espectroscopía en fase sólida)
SWNT	<i>Single-walled nanotubes</i> (Nanotubos de pared simple)
TBZ	<i>Thiabendazole</i> (Tiabendazol)
UV-Vis	Ultravioleta-visible
WHO	<i>World Health Organization</i> (Organización Mundial de la Salud)