



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Desarrollo y evaluación de nuevas estrategias
y técnicas para mejorar la eficacia en la
preparación de muestra para el análisis
químico

Nikolay Kovachev



Tesis

Doctorales

www.eltallerdigital.com

UNIVERSIDAD de ALICANTE



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Universidad de Alicante

Facultad de Ciencias

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología

**DESARROLLO Y EVALUACIÓN
DE NUEVAS ESTRATEGIAS Y TÉCNICAS
PARA MEJORAR LA EFICACIA EN LA
PREPARACIÓN DE MUESTRA
PARA EL ANÁLISIS QUÍMICO**

**Memoria presentada por Nikolay Kovachev
para la obtención del título de Doctor en Química,
(modalidad de Doctorado Internacional)**

Alicante, enero de 2014

JUAN MORA PASTOR

Director del Departamento de Química Analítica,
Nutrición y Bromatología de la Facultad de
Ciencias de la Universidad de Alicante,

Certifica que,

D. NIKOLAY KOVACHEV ha realizado bajo la dirección de los profesores Dr. D. ANTONIO CANALS HERNÁNDEZ y Dra. Dña. MONTSERRAT HIDALGO NUÑEZ, el trabajo bibliográfico y experimental correspondiente a la obtención del Grado de Doctor en Química (modalidad de Doctorado Internacional) sobre el tema: **“Desarrollo y evaluación de nuevas estrategias y técnicas para mejorar la eficacia en la preparación de muestra para el análisis químico”**.

Alicante, diciembre de 2013

Fdo. Dr. Juan Mora Pastor



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Departament de Química Analítica, Nutrició i Bromatologia

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología

Los profesores Dr. D. ANTONIO CANALS HERNÁNDEZ y Dra. Dña. MONTSERRAT HIDALGO NUÑEZ del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Universidad de Alicante, en calidad de Directores de la Tesis Doctoral (modalidad de Doctorado Internacional) presentada por D. NIKOLAY KOVACHEV, con el título **“Desarrollo y evaluación de nuevas estrategias y técnicas para mejorar la eficacia en la preparación de muestra para el análisis químico”**.

Certifican que,

la citada Tesis Doctoral se ha realizado en los laboratorios del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Universidad de Alicante y en los laboratorios del Departamento de Química Analítica y Química Computacional de la Universidad de Plovdiv (Bulgaria), y que, a su juicio, reúne los requisitos necesarios exigidos en este tipo de trabajos.

Alicante, diciembre de 2013

Fdo. D. Antonio Canals Hernández

Fdo. Dña. Montserrat Hidalgo Núñez

Este trabajo se ha hecho realidad con la ayuda, el apoyo y el cariño de muchas personas. Estoy enormemente agradecido a:

Mis directores Antonio y Montse por darme la oportunidad, por creer en mí, por todo lo que me han enseñado, por su enorme paciencia y por el honor de estar a su lado.

Todos los compañeros en Alicante con los que estoy cada día y los que siento como hermanos. La gente maravillosa de Plovdiv y de Alcalá de Henares, los que siempre llevaré en mi corazón.

Mi mamá y mi hermano, que siempre están a mi lado. Mi papá y mis abuelas que también están conmigo desde el cielo. Mi Dagmara, por todo el amor del mundo.

También quiero agradecer a los profesores, administración y compañeros del Departamento de Química Analítica Nutrición y Bromatología de la Universidad de Alicante, el departamento de Química Analítica y Química Computacional de la Universidad de Plovdiv y el Departamento de Química Analítica e Ingeniería Química de la Universidad de Alcalá, con los que he compartido momentos muy entrañables. A la Universidad de Alicante y a la Generalidad Valenciana por las becas que he disfrutado.

ABSTRACT

The term sample preparation indicates “the conversion of the real sample into a form suitable for its determination”. The processes applied in the simple preparation include homogenisation, drying, milling, conservation, organic matter destruction, analyte separation and/or concentration, derivatization, etc. Sample preparation is considered one of the critical steps of the total analytical process and a source of uncertainty en errors, because it is often complex, lengthy and laborious. Some of the sample preparation methods still applied nowadays were developed in the XIX century. This is why, the development of new, advanced and simple methods of sample preparation for determination and quantification of chemical composition of the sample is an object of constant interes in analytical chemistry. On one hand, the main goal of this interes is to improve the performance of the methods applied. On the other hand, there is a lot of research going on the development of environmentally friendly methods following the goals of the “green chemistry”, aiming to improve or eliminate contamination produced by the analytical laboratories.

Between the current significant tendencies in sample preparation research, the following deserve special attention:

- *Use of new radiation sources as a tool for activation and/or acceleration of various physic-chemical processes. Many of the steps in sample preparation are being activated or accelerated by external energy, which is normally applied in form of heat. The use of new and more efficient energy sources like microwaves, ultrasound or lasers presents various advantages, like time reduction, selectivity and focalization of the treatment, specific non-thermal effects, etc.*
- *Miniaturization. This tendency consists in a significant reduction in the size of the tools used, the quantity of sample and reagents and in the sample preparation time. It is unquestionably, one of the most current tendencies because of the great impact provoked by its development and because of the nanotechnology application.*
- *Simplification and automation. The development of new analytical tools opens the possibility to simplify drastically the sample preparation. This could be achieved by reduction of the processes applied or integration of various*

processes on a single device. On the other hand, the automation implies reduction or elimination of human participation in repetitive operations, which improves the analytical characteristics, mainly the precision.

- *Hyphenated techniques development. The possibility to combine different sample preparation procedures with other stages of the total analytical process on a single tool combines the advantages already indicated above and, at the same time, marks the definitive tendency in analytical chemistry research and development – the existence of total analytical systems (TAS), which incorporate all the stages of the chemical analysis.*

Taking the above into account the present thesis approaches the sample preparation research from different perspectives that correspond to the already mentioned current tendencies. Therefore, the present memory is divided in four chapters each of which presents the development of new tools, strategies and methods for sample preparation:

- *Chapter 1: In this chapter the use of microwave energy is applied for acceleration of the sample preparation process. A system for preconcentration and matrix separation of Pd and Pt by microwave-assisted solid phase extraction prior ICP-MS determination has been constructed. The system's work parameters have been evaluated and optimised for maximum performance and the analytical figures of merit have been determined. Finally, the system has been applied to the analysis of Pd in certified reference materials (human urine and serum) and to the analysis of Pd and Pt in airborne particulate matter.*
- *Chapter 2: Secondly, a new prototype of multiple nebulizer based on the Flow-Focusing[®] nebulization principle has been developed and constructed. The multiple nebulizers consists of four nebulization units incorporated in a single body with separate liquid feed ducts and common nebulization gas inlet. A dedicated spray chamber has also been developed for the connection of the nebulizer to an ICP-OES spectrometer. The new sample introduction system has been optimised and characterised, and has been applied to the analysis of various elements in certified reference material. Additionally, the system developed has been applied to analysis by online standard addition calibration*

by aerosol mixing in order to demonstrate its abilities to perform automated “in-chamber” sample preparation procedures.

- *Chapter 3: In this chapter the possibilities offered by the miniaturization for integration and improvement of existing analytical strategies has been studied. To this end, a microfluidic platform for capillary electrophoresis and amperometric detection has been applied for creative group and individual determination natural antioxidants in complex food samples.*
- *Chapter 4: Finally, the experience achieved in the last two studies has been combined for the development and evaluation of a novel hyphenated system for capillary electrophoresis and determination based on plasma spectrometry. The electrophoretic system incorporates a dedicated Flow-Focusing[®] nebulization unit in order to eliminate the flow incompatibility between the separation and the detection techniques and to achieve high level of sample transport to the plasma. The system has been optimised and characterised in ICP-OES and ICP-MS and its analytical figures of merit have been determined.*

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN GENERAL	7
I.1. La química analítica y su relación con la ciencia y la sociedad moderna.....	9
I.2. El proceso analítico total	10
I.3. La preparación de la muestra y las tendencias actuales en su desarrollo	12
I.4. Estructura de la tesis presente	13
I.5. Referencias	16
II. CAPÍTULO 1 - MÉTODO DE PREPARACIÓN DE MUESTRAS ASISTIDO POR MICROONDAS PARA LA DETERMINACIÓN DE Pd Y Pt MEDIANTE ICP-MS	17
II.1. Introducción	19
II.1.1. Fundamentos de la interacción de la energía de microondas con la materia	19
II.1.1.1. Calentamiento mediante energía de microondas	20
II.1.1.2. <i>Efectos de la viscosidad, temperatura y cantidad de muestra en la eficiencia del calentamiento por microondas</i>	22
II.1.1.3. <i>Efectos no térmicos provocados por el campo de microondas</i>	24
II.1.2. Preparación de muestras asistida por microondas para la determinación de analitos inorgánicos	25
II.1.2.1. <i>Formación de complejos</i>	26
II.1.3. Componentes de un horno de microondas	27
II.1.4. Tipos de hornos de microondas	30
II.1.4.1. <i>Sistemas cerrados (con reactores a presión) no focalizados</i>	30
II.1.4.2. <i>Sistemas abiertos focalizados</i>	32
II.1.4.3. <i>Sistemas combinados (cerrados y focalizados)</i>	32
II.1.4.4. <i>Hornos de microondas domésticos</i>	33
II.2. Objetivo y plan del trabajo experimental.....	35
II.2.1. Objetivo	35
II.2.2. Plan de trabajo.....	35
II.3. Resultados experimentales.....	36
II.3.1. Introduction.....	36

II.3.2. Experimental	37
II.3.2.1. Instrumentation	37
II.3.2.2. Reagents	39
II.3.2.3. Certified reference materials and real samples	40
II.3.2.4. Procedures	41
II.3.2.4.1. Microcolumn packing and conditioning	41
II.3.2.4.2. Concentration and matrix separation of Pd and Pt	41
II.3.3. Results and discussion	42
II.3.3.1. Sorption	42
II.3.3.1.1. Sample acidity	42
II.3.3.1.2. Sample flow rate	43
II.3.3.1.3. Column capacity	43
II.3.3.2. Elution	44
II.3.3.2.1. Microwave field effect	44
II.3.3.2.2. Microcolumn positioning inside the microwave oven	45
II.3.3.2.3. Eluent concentration	46
II.3.3.2.4. Eluent flow rate	47
II.3.3.3. ICP-MS determination	48
II.3.3.3.1. Nebuliser feeding	48
II.3.3.3.2. Internal standard	49
II.3.3.4. Method performance	49
II.3.3.4.1. Matrix separation efficiency	49
II.3.3.4.2. Analytical figures of merit	50
II.3.3.5. Analyses of real samples and certified reference materials	52
II.3.4. Conclusions	53
II.4. Referencias	55
III. CAPÍTULO 2 - DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE UN SISTEMA DE INTRODUCCIÓN DE MUESTRAS MÚLTIPLE, PARA LAS TÉCNICAS ANALÍTICAS BASADAS EN PLASMA DE ACOPLAMIENTO INDUCTIVO .	61
III.1. Introducción	63
III.1.1. Espectrometría de emisión óptica por plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES)	64
III.1.2. Sistemas de introducción de muestras líquidas en ICP-OES/MS	68
III.1.3. Nebulizadores	70

<i>III.1.3.1. Micronebulizadores</i>	73
<i>III.1.3.2. Nebulizador neumático concéntrico</i>	74
<i>III.1.3.3. Tecnologías de nebulización Flow Focusing[®] y Flow Blurring[®]</i>	75
<i>III.1.3.3.1. Tecnología Flow Focusing[®]</i>	76
<i>III.1.3.3.2. Tecnología Flow Blurring[®]</i>	80
<i>III.1.4. Cámaras de nebulización</i>	82
<i>III.1.5. Sistemas múltiples de introducción de muestras en plasmas</i>	87
<i>III.1.5.1. Sistemas que incorporan un nebulizador con varios orificios (nebulizador múltiple)</i>	88
<i>III.1.5.2. Sistemas que incorporan varios nebulizadores mediante entradas distintas en una cámara de nebulización modificada</i>	89
<i>III.1.5.3. Sistemas que incorporan dos cámaras de nebulización distintas, cada una equipada con un nebulizador</i>	92
III.2. Objetivo y plan del trabajo experimental del capítulo 2	93
III.2.1. Objetivo	93
III.2.2. Plan de trabajo	93
III.3. Resultados experimentales	94
III.3.1. Introduction	94
III.3.2. Experimental	96
<i>III.3.2.1. Nebulizer description</i>	<i>96</i>
<i>III.3.2.2. Dedicated spray chamber design</i>	<i>97</i>
<i>III.3.2.3. Drop size and velocity measurement instrumentation</i>	<i>98</i>
<i>III.3.2.4. ICP-OES instrumentation</i>	<i>98</i>
<i>III.3.2.5. Solvent and analyte transport rate measurements</i>	<i>100</i>
<i>III.3.2.6. Reagents</i>	<i>101</i>
III.3.3. Results and discussion	101
<i>III.3.3.1. Dedicated spray chamber optimization</i>	<i>101</i>
<i>III.3.3.2. Individual nozzle performance</i>	<i>102</i>
<i>III.3.3.3. Nebulization parameters characterization</i>	<i>105</i>
<i>III.3.3.3.1. Nebulizing gas flow</i>	<i>105</i>
<i>III.3.3.3.2. Sample liquid flow</i>	<i>107</i>
<i>III.3.3.4. Analytical figures of merit of the FFMNS in ICP-OES and comparison with a conventional sample introduction system</i>	<i>108</i>
<i>III.3.3.4.1. Sensitivity</i>	<i>110</i>

III.3.3.4.2. Precision.....	112
III.3.3.4.3. Limits of detection	112
III.3.3.4.4. Accuracy (analysis of certified reference material)	112
III.3.3.5. ‘‘In chamber’’ standard addition calibration	113
III.3.4. Conclusions	116
III.4. Referencias	117
IV. CAPÍTULO 3 - CHIPS MICROFLUÍDICOS RÁPIDOS Y SELECTIVOS PARA LA DETECCIÓN ELECTROQUÍMICA DE ANTIOXIDANTES EN MUESTRAS COMPLEJAS	127
IV.1. Introducción	129
IV.1.1. Miniaturización en sistemas analíticos.....	129
IV.1.2. Sistemas analíticos miniaturizados, basados en flujo electroosmótico	130
IV.1.2.1. Electroforesis capilar (CE) en microchip.....	130
IV.1.2.2. Modalidades de CE en microchip.....	132
IV.1.2.3. Materiales y técnicas de fabricación de microchips de CE	135
IV.1.2.3.1. Materiales	135
IV.1.2.3.2. Técnicas de fabricación	136
IV.1.2.4. Métodos de detección en microchips de CE	138
IV.1.2.4.1. Detección óptica	139
IV.1.2.4.2. Detección electroquímica (ECD).....	139
IV.2. Objetivo y plan de trabajo	142
IV.2.1. Objetivo	142
IV.2.2. Plan de trabajo	142
IV.3. Resultados experimentales	143
IV.3.1. Introduction	143
IV.3.2. Experimental	145
IV.3.2.1. Reagents and standards	145
IV.3.2.2. Apparatus.....	145
IV.3.2.3. Procedures	147
IV.3.2.3.1. Standards	147
IV.3.2.3.2. Sample preparation	147
IV.3.2.3.3. Electrophoretic Procedure and Amperometric Detection	147
IV.3.2.4. Safety considerations	148
IV.3.3. Results and discussion.....	149

<i>IV.3.3.1. Analytical Strategy Proposal</i>	149
<i>IV.3.3.2. Class-selective electrochemical index determination of natural antioxidants</i>	151
<i>IV.3.3.3. Individual determination of natural antioxidants</i>	156
<i>IV.3.3.4. Analytical integration and simplification strategies for natural antioxidant analysis on microfluidic electrochemistry chips</i>	161
IV.3.4. Conclusions	164
IV.4. Referencias	165
V. CAPITULO 4 - MEJORAS EN LA ESPECIACIÓN ELEMENTAL MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA ATÓMICA BASADA EN PLASMA DE ACOPLAMIENTO INDUCTIVO - UTILIZACIÓN DE NEBULIZACIÓN FLOW FOCUSING®	173
V.1. Introducción	175
V.1.1. Técnicas analíticas empleadas en la especiación elemental	176
V.1.2. Electroforesis capilar (CE) en la especiación elemental.....	178
V.1.3. Aspectos fundamentales de la electroforesis capilar	179
V.1.4. Aplicación de la electroforesis capilar en especiación elemental.....	181
V.1.5. Sistemas de detección usados en electroforesis capilar	182
V.1.6. Interfases entre CE y los sistemas de detección elemental basados en ICP	183
<i>V.1.6.1. Interfases CE-ICP directas</i>	184
<i>V.1.6.2. Interfases CE-ICP con flujo líquido auxiliar</i>	185
<i>V.1.6.3. Interfases CE-ICP basadas en la generación de especies volátiles</i>	189
V.2. Objetivos y plan de trabajo	191
V.2.1. Objetivo	191
V.2.2. Plan de trabajo	191
V.3. Resultados experimentales del capítulo 4.....	192
V.3.1. Introduction	192
V.3.2. Experimental.....	193
<i>V.3.2.1. Instrumentation</i>	193
<i>V.3.2.2. Reagents</i>	196
<i>V.3.2.3. Procedure</i>	197
<i>V.3.2.4. Safety Considerations</i>	197
V.3.3. Results and discussion	198

<i>V.3.3.1. Proof of concept</i>	198
<i>V.3.3.2. Pressure-induced and electroosmotic carrier electrolyte flow</i>	199
<i>V.3.3.3. Electrophoretic separation parameters study and optimisation</i>	200
<i>V.3.3.3.1. Separation capillary length</i>	200
<i>V.3.3.4. System performance characteristics</i>	204
V.3.4. Conclusions	206
V.4. Referencias	207
VI. CONCLUSIONES GENERALES	213

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

I.1. La química analítica y su relación con la ciencia y la sociedad moderna

La ciencia química se puede definir como *la investigación sistemática de la composición, estructura, propiedades físicas y reactividad de la materia*. Tradicionalmente, dividimos la química en cinco campos fundamentales: química-física, química inorgánica, química orgánica, bioquímica y química analítica. Dentro de éste ámbito de conocimiento tan amplio, la química analítica es a menudo definida como *el área de la química responsable de la caracterización de la composición cualitativa y cuantitativa de la materia*. Sin embargo, esta es una descripción parcial puesto que la función de la química analítica no solo es realizar el análisis de muestras de forma rutinaria, sino también desarrollar, mejorar y adaptar estrategias y métodos de medidas de fenómenos químicos [1].

Por ello, una definición más apropiada química analítica podría ser: *“La química analítica es una ciencia metrológica que desarrolla, optimiza y aplica herramientas (materiales, metodológicas y estratégicas) de amplia naturaleza, que se concentran en procesos de medida encaminados a obtener información (bio)química de calidad tanto parcial (presencia/concentración en muestra de especies-analitos (bio)químicos) como global sobre materias o sistemas de amplia naturaleza (química, bioquímica, biológica) en el espacio y en el tiempo para resolver problemas científicos, técnicos, económicos y sociales”*[2].

Como puede observarse en la Figura I.1 ([3]), las ciencias químicas se pueden situar en una posición intermedia entre las ciencias puramente exactas como las matemáticas y las ciencias puramente humanas como las sociológicas. Esta observación es aún más válida para la química analítica ya que, por un lado, utiliza los fundamentos de las demás áreas de la ciencia para el desarrollo de nuevos métodos de análisis y, por otro lado, proporciona información tanto teórica, para el desarrollo de las ciencias, como práctica, demandada y usada en los distintos aspectos de la vida humana. Como se muestra en el esquema en la Figura I.1, la aplicación de los desarrollos de la química analítica tiene un papel muy importante en la vida moderna, por ser una herramienta de medida que proporciona información para la ciencia, la tecnología y su impacto sobre el medio ambiente y la sociedad.

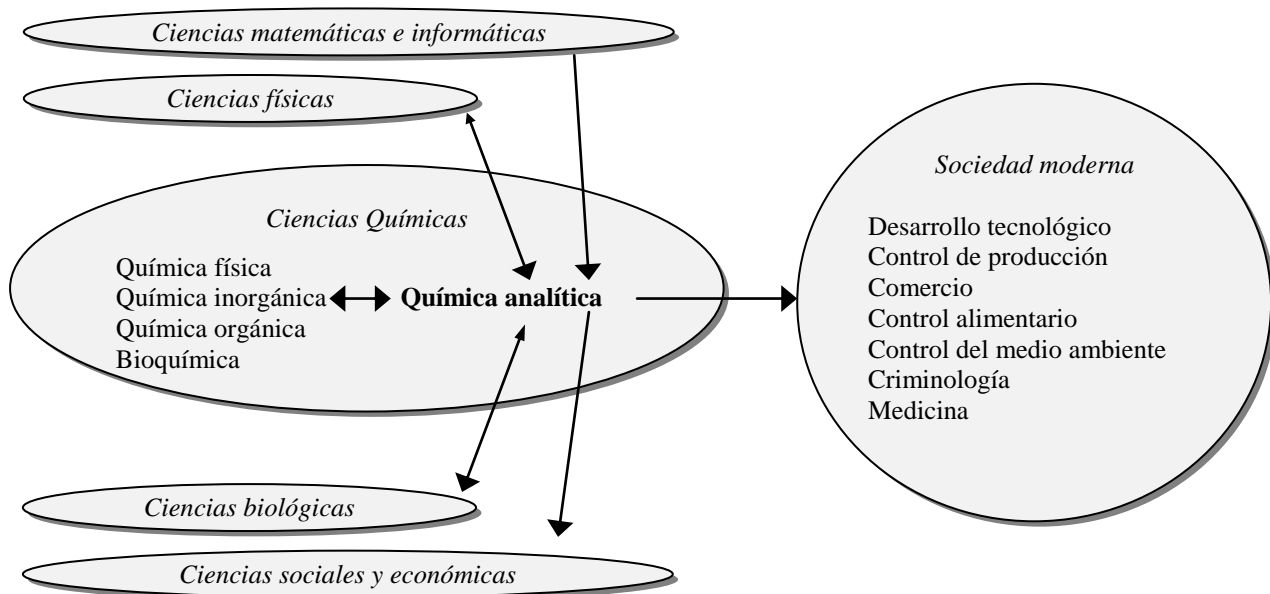


Figura I.1: Relación de la química analítica con las otras áreas de la ciencia y su impacto sobre los aspectos de la vida humana [3].

I.2. El proceso analítico total

Al igual que en todas las ciencias experimentales, la información proporcionada por la química analítica se obtiene mediante una metodología general denominada, en éste caso, Proceso Analítico Total (PAT). Éste puede ser descrito por un conjunto de objetivos entre los que se encuentran [4]:

- Definir correctamente el problema planteado;
- Asegurar que la muestra tomada representa correctamente el problema;
- Contactar con el cliente para obtener la máxima información posible sobre el problema analítico, y definir el tiempo disponible así como la exactitud requerida;
- Desarrollar un plan de trabajo analítico teniendo en cuenta para ello los métodos analíticos más adecuados;
- Realizar el trabajo con el máximo nivel de calidad, experiencia y conocimiento del analista;

- Suministrar respuestas, los que incluyen la precisión de todos los datos incluidos y especificando las limitaciones para la posible interpretación de los datos;
- Suministrar un informe final claro, consistente y significativo, en el cual se interprete y explique la información y los datos incluidos.

Para conseguir dichos objetivos el PAT puede desarrollarse como una secuencia de los siguientes etapas o pasos [4]:

- Determinación general del problema desde puntos de vista socio-económicos o técnico-científicos;
- Determinación concreta del problema analítico y definición de los objetivos;
- Selección del procedimiento analítico;
- Toma de muestras;
- Preparación de las muestras;
- Medición de las muestras;
- Tratamiento y evaluación de los datos;
- Interpretación de los resultados y propuesta de las conclusiones;
- Informe final.

Tanto el número como el tipo de las etapas incluidas en el PAT no es un tema fijo y cerrado, sin posibilidad de realizar aportaciones o modificaciones. Esto se debe, por una parte, a la gran variedad de los problemas analíticos y, por otra, al constante progreso de las técnicas usadas, lo que conlleva a la creación de nuevos pasos (por ejemplo, nuevas técnicas de pretratamiento de muestras, o nuevas técnicas de diseño de experimentos), o bien elimina las fronteras entre pasos anteriormente distintos (mediante la integración de técnicas distintas en un solo instrumento, como es la cromatografía y el uso de los ordenadores para el tratamiento y la interpretación de los datos obtenidos).

I.3. La preparación de la muestra y las tendencias actuales en su desarrollo

Con el término *preparación de la muestra* tratamos de indicar “*la conversión de la muestra real en una forma adecuada para la medición*”. El conjunto de procedimientos empleados en la preparación de muestras es bastante amplio e incluye procesos como la homogenización, secado, trituración/tamizado, conservación, disolución/digestión, destrucción de la materia orgánica, separación de los analitos de la matriz, concentración de los componentes de interés, reacciones químicas (derivatización), entre otros. Entre los pasos del PAT, la preparación de la muestra sigue siendo una etapa limitante y fuente frecuente de errores e incertidumbre debido a la lentitud, laboriosidad y complejidad de algunos de los procedimientos que incluye.

Algunos de los métodos de preparación de muestras que se siguen usando en la actualidad fueron desarrollados en el siglo XIX. Sin embargo, el desarrollo de nuevos métodos avanzados y sencillos de preparación de muestras para la determinación y cuantificación de su composición química es una de las áreas más importantes y activas en la química analítica actual y, como tal, es objeto de un constante interés por parte de muchos investigadores. Por un lado el objetivo es mejorar el rendimiento de los métodos empleados. Por otro lado es cada vez más popular el desarrollo de métodos respetuosos con el medio ambiente, según los principios de la “química verde” [5], con el objetivo de disminuir y/o eliminar la contaminación medioambiental producida por los laboratorios analíticos.

Entre las tendencias más significativas en la investigación y desarrollo de la química analítica en general y de la preparación de la muestra en particular actual podemos destacar las siguientes:

- *Utilización de nuevas fuentes de radiación como método para la activación y/o aceleración de determinados procesos físico-químicos.* Muchos de los procesos que intervienen durante la preparación de la muestra se activan o aceleran mediante energía externa, frecuentemente de calor. La sustitución de las fuentes de energía tradicionales por otras nuevas y más eficaces, como la radiación de microondas, la energía de ultrasonidos o la energía proporcionada por un laser presenta una serie de ventajas entre las que se encuentran la reducción

del tiempo del proceso, posibilidades de tratamiento selectivo y/o focalizado, efectos específicos no térmicos sobre la muestra, entre otros.

- *Miniaturización.* Esta tendencia se materializa en la reducción drástica del tamaño de las herramientas usadas, la cantidad tanto de los reactivos como de la muestra así como del tiempo en las etapas de preparación de la muestra. Sin duda es una de las tendencias más actuales en química analítica debido al gran impacto provocado por el amplio desarrollo, por un lado, de los sistemas microfluidicos y, por otro lado, de la nanotecnología.

- *Simplificación y automatización.* El desarrollo de nuevas herramientas analíticas abre la posibilidad de simplificar drásticamente la preparación de la muestra. Esto se podría conseguir mediante reducción del número de los procesos implicados o mediante la integración de varios procesos sobre un único dispositivo. Por otro lado, la automatización de un proceso a menudo implica la reducción (o eliminación) de la participación humana en el mismo, lo que implica mejora en las propiedades analíticas, sobre todo en la precisión. Aunque el nivel de automatización en la instrumentación y el tratamiento de datos está hoy día muy avanzado, su integración en la preparación de la muestra es todavía escasa.

- *Desarrollo de técnicas híbridas.* La posibilidad de combinar distintos procedimientos de preparación de la muestra o, incluso distintas etapas del proceso analítico total en una solo herramienta combina las ventajas ya indicadas entre las tendencias mencionadas anteriormente a la vez que marca la tendencia final del desarrollo del proceso analítico total, es decir, la existencia de sistemas analíticos totales miniaturizados (i.e. μ TAS), los cuales incorporan todos los pasos de un análisis químico.

I.4. Estructura de la tesis presente

La tesis presentada trata de abarcar el amplio tema de la preparación de la muestra con fines analíticos desde distintas perspectivas, que pretenden corresponderse con las tendencias actuales mencionadas en el apartado anterior. Por tal fin, la memoria presente se divide en cuatro apartados o capítulos. Cada capítulo trata de abordar y

resolver un problema concreto siguiendo los principios de la química ambiente ecológica prestando una especial atención a la etapa de preparación de la muestra. Los capítulos consisten en una introducción, en la cual se presenta brevemente el estado actual del tema con las características y las problemáticas de la tecnología actualmente existente y se discuten las posibilidades de desarrollo, incluyendo los objetivos de la investigación. La segunda parte de cada capítulo consiste en un desarrollo experimental, en el que se exponen los experimentos realizados y se discuten los resultados más relevantes obtenidos. Los capítulos que constituyen la presente tesis se discuten brevemente a continuación.

- **Capítulo 1:** En primer lugar se investiga el uso de la radiación electromagnética de microondas para la activación y aceleración de la etapa de desorción en los procesos de extracción en fase sólida, con el objetivo de mejorar el proceso de preconcentración de los analitos y su separación de la matriz de la muestra. Para ello, utiliza un horno de microondas doméstico que permite acelerar la desorción de Pd y Pt como etapa previa a su determinación por espectrometría atómica de masas con fuente de ionización de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS);

- **Capítulo 2:** En segundo lugar se desarrolla y estudia un nuevo prototipo de nebulizador múltiple basado en el principio de nebulización denominado “Flow Focusing”[®], para su uso con las técnicas analíticas espectrales basadas en plasma de acoplamiento inductivo (ICP). La principal ventaja que ofrece este dispositivo es que permite la nebulización simultánea de distintas disoluciones, utilizando un orificio de nebulización diferente para cada una de ellas, abriendo así nuevas rutas creativas de preparación de la muestra en el interior de la cámara de nebulización. El nuevo nebulizador múltiple desarrollado se estudia y caracteriza utilizando la técnica de espectrometría atómica de emisión con fuente de excitación de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES). Finalmente el nebulizador múltiple es aplicado al análisis de muestras certificadas de referencia, tanto en modo convencional, como aplicando la técnica de calibración mediante adición de patrón en línea;

- **Capítulo 3:** En tercer lugar se estudian las posibilidades que ofrece la miniaturización de la instrumentación analítica para integrar y mejorar las estrategias analíticas existentes. Para ello, se investiga la aplicación de

plataformas microfluídicas (microchips) de electroforesis capilar con detección electroquímica para la determinación de antioxidantes naturales en alimentos.

- **Capítulo 4:** Finalmente, los dos últimos estudios descritos anteriormente se combinan dando lugar al desarrollo y la evaluación de un novedoso sistema integrado constituido por una electroforesis capilar y un nebulizador basado en el mecanismo “Flow Focusing”[®] (CEFFS, “Capillary Electrophoresis “Flow Focusing”[®] Nebulization System”). Dicho sistema podría ser de gran utilidad para llevar a cabo análisis de especiación elemental mediante técnicas de espectrometría atómica basadas en ICP. En concreto, el sistema desarrollado se estudia y caracteriza utilizando las técnicas ICP-OES e ICP-MS para la separación de especies de cromo en aguas.

I.5. Referencias

- [1]. G.M. Hieftje, *The two sides of analytical chemistry*, Anal. Chem., 1985, **57**, 256A.
- [2]. M. Valcárcel, *Principios de química analítica*, Springer-Verlag Ibérica S.A., 1999.
- [3]. G. Andreev, Comunicación personal, 2009.
- [4]. C.E. Domini, D. Hristozov, B. Almagro, I.P. Roman, S. Prats y A. Canals, "Sample preparation for chromatographic analysis of environmental samples", en "*Chromatographic analysis of the environment*", L.M. Nollet (ed.), Taylor and Francis Inc., 3 edn., 2006, p. 31.
- [5]. M. Tobiszewski, A. Mechlinska y J. Namiesnik, *Green analytical chemistry-theory and practice*, Chem. Soc. Rev., 2010, **39**, 2869.

II. CAPÍTULO 1

MÉTODO DE PREPARACIÓN DE MUESTRAS ASISTIDO POR MICROONDAS PARA LA DETERMINACIÓN DE Pd Y Pt MEDIANTE ICP-MS

II.1. Introducción

II.1.1. Fundamentos de la interacción de la energía de microondas con la materia

La eficiencia de un método de preparación de muestras depende en gran parte de la velocidad del proceso fisicoquímico involucrado y del grado de cuantitatividad de éste. Por este motivo se han venido desarrollando una gran variedad de métodos de preparación de muestras basados en diferentes procesos fisicoquímicos, tales como métodos fotoquímicos, catalíticos o favorecidos por la energía de ultrasonidos, entre otros. Aun así, el factor más influyente sobre las reacciones en disolución o en sistemas heterogéneos sigue siendo el aumento de la temperatura. El calentamiento de las muestras líquidas mediante el método convencional (conectivo-convectivo) tiene, sin embargo, la desventaja de presentar una transferencia de calor muy lenta desde la fuente de calor hacia la muestra (conducción), o incluso dentro de la muestra misma (convección). Un método alternativo, que ha mostrado sus posibilidades para el aumento rápido de la temperatura de una mezcla de reacción, es la exposición de ésta a la radiación de microondas.

La radiación de microondas forma parte del espectro electromagnético, encontrándose en la región situada entre las ondas de radio y la radiación infrarroja. Abarca longitudes de onda entre 0.01 m y 1 m que corresponden a frecuencias entre 30 GHz y 300 MHz, respectivamente. Desde un punto de vista sencillo, esta radiación no ionizante causa un movimiento de moléculas o iones por migración de iones y por rotación dipolar, pero no provoca cambios en la estructura de las moléculas. En la Figura II.1 ([1]) se muestra el espectro electromagnético y la posición de la radiación de microondas dentro de él.

Las frecuencias de microondas más usadas para uso industrial, científico y médico son 915 ± 25 ; 2450 ± 13 ; 5800 ± 75 y 22125 ± 125 MHz, que han sido establecidas conforme a las Regulaciones Internacionales de Radio adoptadas en Génova en 1959 con el fin de evitar interferencias en los canales usados para las comunicaciones [2].

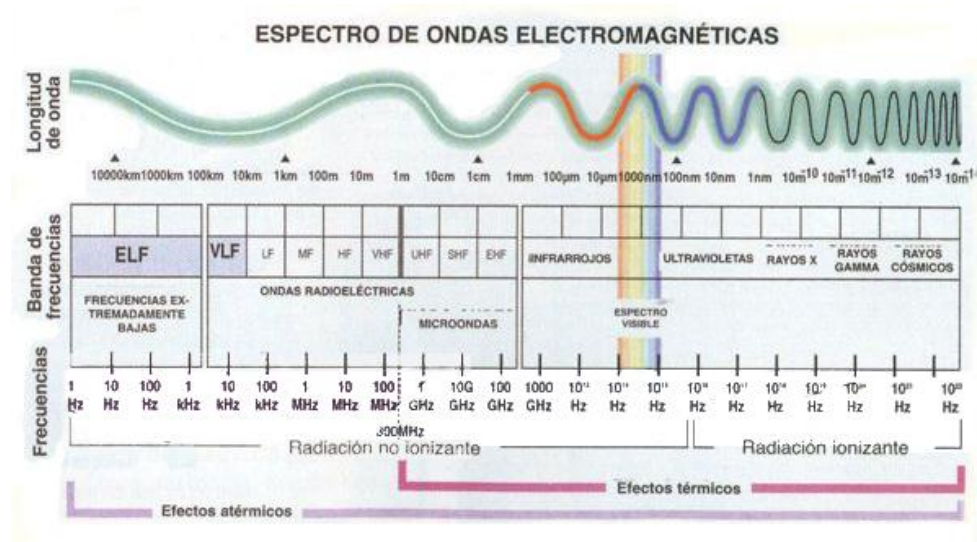


Figura II.1: Espectro electromagnético [1].

II.1.1.1. Calentamiento mediante energía de microondas

El calentamiento de un material mediante radiación de microondas se produce como consecuencia de la interacción entre la componente eléctrica de la radiación y las partículas cargadas (iones, dipolos) presentes en el material. El parámetro que describe la capacidad de un material para absorber energía electromagnética y convertirla en calor se expresa por la siguiente relación:

$$\tan \delta = \frac{\varepsilon''}{\varepsilon'} \quad (\text{II.1})$$

donde: $\tan \delta$ es el *factor de disipación* (tangente del ángulo de pérdida); ε' es la *permitividad real*, que expresa la capacidad de polarización de un material por un campo eléctrico externo, es decir, la facilidad para absorber energía electromagnética; ε'' es el *factor de pérdida de dieléctrico*, que expresa la eficiencia con la que la energía electromagnética es convertida en calor.

La *pérdida de dieléctrico* está relacionada con el movimiento de cargas provocado por el campo electromagnético y puede deberse a los fenómenos de *polarización dieléctrica* y *conducción iónica* [2,3].

Polarización dieléctrica

Cuando las partículas cargadas están unidas entre sí o a otras especies, el efecto de la radiación de microondas sobre ellas tiene como consecuencia la orientación de éstas. Este efecto se conoce como polarización dieléctrica (α) y se expresa como suma de cuatro componentes (Figura II.2, [4]):

- *Polarización electrónica (α_e)*, ocasionada por la distorsión de las órbitas electrónicas alrededor del núcleo;
- *Polarización iónica o atómica (α_a)*, ocasionada por el desplazamiento relativo de los núcleos como consecuencia de la distribución desigual de cargas en la molécula;
- *Polarización dipolar u orientada (α_d)*, debida a la orientación de las moléculas con momento dipolar permanente como consecuencia del campo eléctrico;
- *Polarización de carga en el espacio o interfacial (α_i)*, debida al desplazamiento de electrones libres.

En la Figura II.2 se muestran de forma gráfica los diferentes mecanismos de polarización dieléctrica descritos.

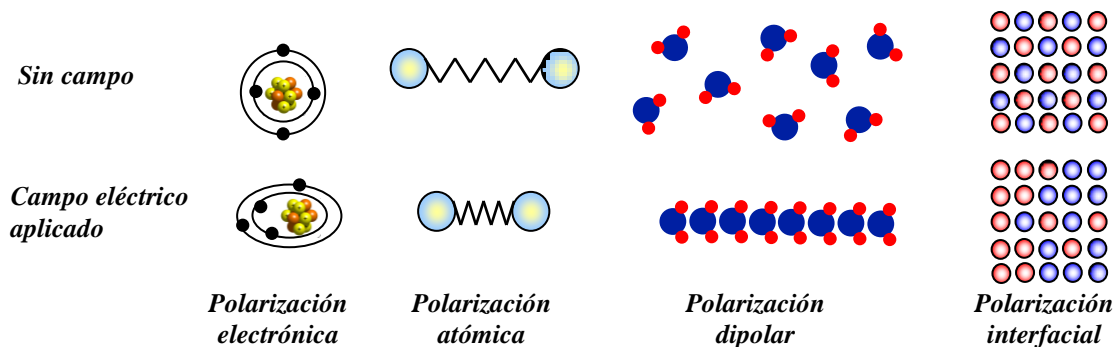


Figura II.2: Mecanismos de polarización dieléctrica [4].

Dentro de la polarización dieléctrica, la *polarización dipolar* y la *polarización interfacial* son los fenómenos más importantes que contribuyen al calentamiento del material debido a la radiación de microondas. La respuesta de las moléculas de líquidos polares ante la acción de un campo eléctrico externo es la de alinearse con el campo mediante un movimiento de rotación. La energía que provoca estos movimientos de

rotación proviene del campo externo (radiación de microondas) y depende de la constante dieléctrica del material. Con radiaciones de baja frecuencia todos los dipolos tienden a alinearse en fase con el campo eléctrico de forma muy uniforme. Esto reduce la posibilidad de colisión entre las moléculas y conlleva a factores de pérdida de dieléctrico bajos, por lo que el calentamiento no es muy efectivo. Por otra parte, utilizando radiación de frecuencia muy elevada, los dipolos no tienen suficiente tiempo para alinearse con el campo, con lo que tampoco se produce calentamiento. La situación óptima se encuentra en el intervalo de frecuencias de la radiación de microondas. Las frecuencias de microondas son lo suficientemente bajas para permitir una adecuada absorción de la radiación, pero a su vez son lo suficientemente altas como para evitar que la frecuencia de rotación de los dipolos se iguale a la suya propia. Esta diferencia de fase entre el campo externo y la rotación de los dipolos (y entre los dipolos entre si) hace que se produzcan colisiones aleatorias entre los dipolos, produciendo un calentamiento de la disolución [2].

Conducción iónica

El otro efecto importante causante del calentamiento por microondas es la conducción iónica que aparece cuando las partículas cargadas pueden moverse libremente por el material (conductor eléctrico). La conducción iónica se produce por la migración de los iones en disolución al aplicar el campo electromagnético y, por tanto, depende de la concentración y movilidad de éstos, así como de la temperatura de la disolución. La migración de los iones genera un flujo de corriente (I), y debido a la resistencia (R) que ofrece la disolución al movimiento de éstos, se producen pérdidas de energía en forma de calor (I^2R). Dicha pérdida de energía es función del tamaño, la carga y la conductividad de los iones en disolución, que están sujetos a interacciones con las moléculas del disolvente, así como de los efectos de interacción iónica con las moléculas de disolvente [2].

II.1.1.2. Efectos de la viscosidad, temperatura y cantidad de muestra en la eficiencia del calentamiento por microondas

Viscosidad

La viscosidad de la muestra afecta a la rotación molecular y, por tanto, a su capacidad de absorber energía de microondas. Así, si la viscosidad aumenta, la rotación

molecular se reduce y, por tanto, disminuye la capacidad de alineación de las moléculas con el campo magnético, con lo que disminuye su factor de disipación.

Temperatura

La temperatura afecta a la rotación dipolar y a la conducción iónica. Para moléculas pequeñas, como en el caso del agua u otros disolventes, la pérdida dieléctrica debida a la rotación de dipolos disminuye cuando la temperatura aumenta. Por el contrario, la pérdida dieléctrica debida a la conducción iónica se incrementa al aumentar la temperatura. Si la concentración de iones o la movilidad de éstos son muy bajas, el calentamiento de la muestra estará dominado por la rotación dipolar. En este caso se justifica que la presencia de agua en una muestra reduzca el factor de disipación al aumentar la temperatura. Así, un mismo incremento de temperatura en una muestra por irradiación con microondas se consigue de forma más rápida a baja que a alta temperatura.

Cantidad de muestra

La cantidad de muestra sometida a radiación de microondas afecta a la distribución de la temperatura de forma distinta que en los métodos clásicos de calentamiento. En los métodos clásicos (Figura II.3, [5]) el calor se transmite por conducción a través del recipiente y por corrientes de convección en el seno de la disolución. Por el contrario, en el calentamiento por microondas el material que contiene la muestra debe ser transparente a la radiación y es la propia mezcla de reacción la que absorbe directamente dicha radiación, produciéndose sobrecalentamientos en puntos concretos que llegan a originar gradientes importantes de temperatura. La muestra absorbe directamente energía de microondas de forma que la temperatura en el interior del material es mayor que en la superficie del recipiente, especialmente en sólidos con baja conductividad térmica. Por otro lado, cuando la cantidad de muestra es elevada y está provista de un valor grande del factor de disipación, el calentamiento que tiene lugar más allá de la profundidad de penetración de las microondas es producido por conducción térmica debida a colisiones moleculares. Por tanto, la temperatura cerca de la superficie será más alta que en el interior. En sistemas que contienen especies químicas con propiedades dieléctricas diferentes dispersas en un medio homogéneo, se puede realizar un calentamiento selectivo de algunas áreas o componentes del sistema. Por tanto, las muestras pequeñas resultan ser más adecuadas para su calentamiento por microondas, a pesar de que una gran cantidad de energía no es absorbida y puede ser

reflejada, lo que podría ocasionalmente causar daños en el magnetrón si no está debidamente protegido [6].

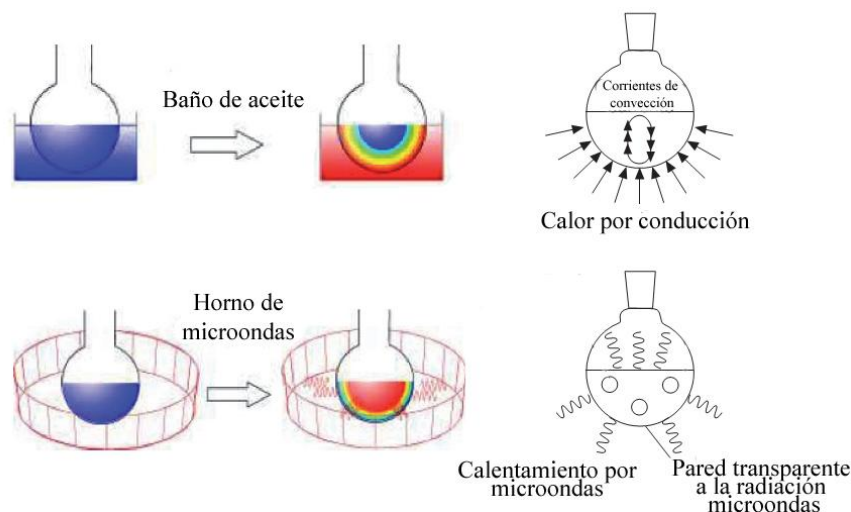


Figura II.3: Calentamiento por conducción-convección y por microondas [5].

II.1.1.3. Efectos no térmicos provocados por el campo de microondas

Hoy día la principal aplicación de la radiación de microondas en los laboratorios analíticos está relacionada con el calentamiento rápido y eficaz que proporciona, por lo que podría parecer que el aumento de la temperatura es la única consecuencia importante de la interacción del campo de microondas con las muestras. De hecho, la energía proporcionada por la radiación microondas es tan baja (alrededor de 1 J mol^{-1}) que no es suficiente para provocar la ruptura de enlaces químicos o incluso de interacciones tan débiles como las fuerzas de Van der Waals (por ejemplo, algunas energías de enlace son: 350 kJ mol^{-1} para el enlace C-H, 20 J mol^{-1} para el enlace por puentes de hidrógeno, o 2.5 J mol^{-1} para las fuerzas de Van der Waals). Sin embargo, la radiación de microondas puede provocar cambios de gran importancia en la reordenación de las moléculas del disolvente y de los iones disueltos (Figura II.4, [7]). Los cambios que se producen en el estado de las capas de solvatación y en la redistribución de la nube electrónica de las moléculas como consecuencia de la interacción con el campo electromagnético influyen en la velocidad y cuantitatividad de muchas reacciones químicas.

Por una parte, el cambio en el estado de la capa de solvatación puede provocar que el ión se vuelva mucho más accesible y, por tanto, más reactivo frente a un ataque nucleófilo (Figura II.4A). Por otra parte, el campo electromagnético produce un

desplazamiento muy rápido (del orden de 10^{-14} s) de la nube electrónica de las moléculas, que se mantiene posteriormente durante un breve periodo de tiempo (del orden de 2.5×10^{-9} s), debido a que, comparativamente, el desplazamiento que se produce en las posiciones de los iones y las moléculas es mucho menor. Los iones en disolución quedan durante este breve período de tiempo activados por el campo (Figura II.4B), pudiendo de esta forma participar en múltiples colisiones (del orden de 10 a 10^3). Esto es importante cuando la energía de microondas se utiliza, por ejemplo, para acelerar reacciones donde los factores estéricos y las configuraciones de las especies reactivas son importantes. Estos efectos producidos por la radiación de microondas no provocan el calentamiento de la muestra sino que pueden considerarse efectos no térmicos de la radiación [7].

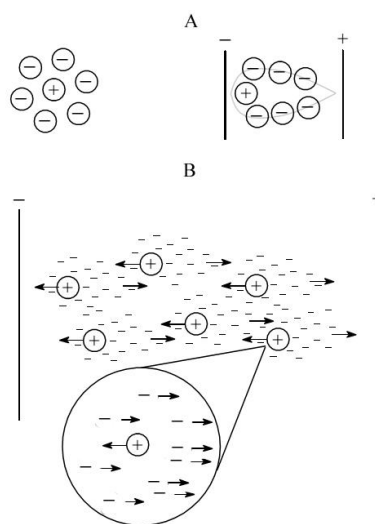


Figura II.4: Cambios en el estado de las capas de solvatación (A) y en la redistribución de la nube electrónica (B) provocados por el campo de microondas [7].

II.1.2. Preparación de muestras asistida por microondas para la determinación de analitos inorgánicos

Muchas operaciones del pretratamiento de muestras se basan en diferentes reacciones químicas e interacciones fisicoquímicas que involucran a los distintos componentes de la muestra. Las reacciones químicas que tienen lugar mediante el calentamiento conductivo-convectivo y el calentamiento por microondas pueden parecer semejantes. Sin embargo, mediante la utilización de las microondas se producen una serie de efectos

adicionales muy significativos debidos a la especificidad del calentamiento inducido por ésta. El desarrollo de métodos de preparación de muestra asistidos por microondas ha sido objeto de varios libros [2] y revisiones [7,8]. Hoy día, la energía microondas se está utilizando para una gran variedad de procesos, algunos de los cuales son más tradicionales, basándose solo en el calentamiento rápido y eficiente debido a las microondas. Entre estos procesos se encuentran el secado [7,9-11], la mineralización por vía seca y fusión [7], la combustión [12,13], extracción [14] y, sobre todo, la digestión de muestras por vía húmeda (que hoy día es un procedimiento rutinario en la mayoría de los laboratorios analíticos modernos) [8], entre otros. Sin embargo, la energía de microondas ha sido también utilizada en la activación de otros procesos de preparación de muestras basados sobre todo en la formación de complejos como son la preconcentración y separación, y reacciones cromogénicas, entre otros.

II.1.2.1. Formación de complejos

La aplicación de las microondas puede favorecer los procesos de formación de complejos, lo cual a su vez puede mejorar los procesos de preparación de muestras basados en extracción (i.e., extracción líquido - líquido o extracción en fase sólida). Por ejemplo, en los procesos de extracción mediante punto de nube la energía de las microondas ha sido utilizada para acelerar el proceso de formación de los complejos de los analitos de interés antes de su migración a la fase orgánica. A la vez, el calentamiento provocado por las microondas sirve para la formación de micelas obteniéndose así el fenómeno llamado “punto de nube” [15-19]. Por otro lado, en la preconcentración y separación de metales nobles por extracción en fase sólida, la radiación de microondas acelera también las reacciones de formación de complejos entre el metal y los diferentes adsorbentes (intercambiadores iónicos o agentes quelatantes) [20]. Por otra parte, la utilización de la radiación de microondas aumenta la eficiencia y la velocidad del proceso de desorción de los analitos retenidos sobre el material adsorbente [21,22].

Las reacciones cromogénicas son reacciones entre metales en disolución y reactivos orgánicos (normalmente agentes complejantes) que dan lugar a compuestos coloreados. Esto permite el análisis cualitativo y cuantitativo de los metales mediante espectrofotometría UV-VIS. La acción de las microondas aumenta la velocidad de

algunas reacciones de este tipo, lo que ha permitido utilizarlas en sistemas de análisis en flujo [23].

II.1.3. Componentes de un horno de microondas

Los hornos de microondas están formados por los siguientes componentes principales: sistema generador de microondas (magnetrón), sistema guía de microondas, circulador, sistema de distribución de energía y cavidad de microondas [24] (Figura II.5, [25]).

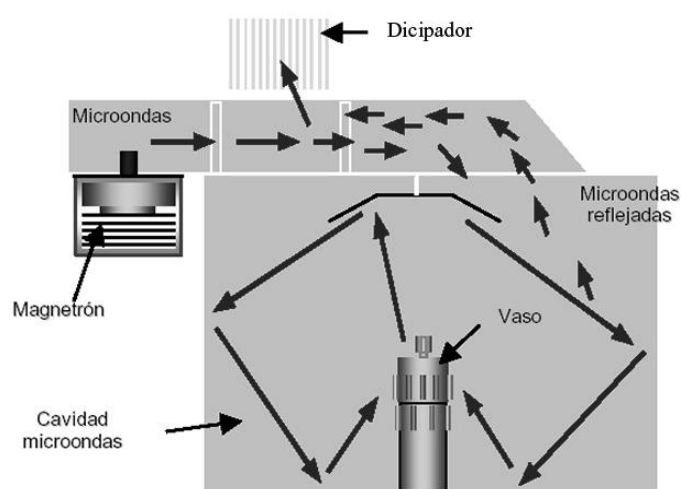


Figura II.5: Esquema de un horno de microondas cerrado típico [25].

Sistema generador de microondas (magnetrón)

El magnetrón consiste en un tubo de vacío (diodo) que transforma la energía eléctrica en energía de microondas. Está constituido por un tubo circular caliente (cátodo) rodeado por un ánodo provisto de cavidades semicilíndricas (Figura II.6, [26]). Mediante un imán permanente o un electroimán se aplica un campo magnético paralelo al eje del cátodo. Cuando entre los dos electrodos se aplica un alto potencial constante, el cátodo emite electrones debido al efecto Edison (emisión termoiónica), los cuales se aceleran hacia el ánodo. La presencia del campo magnético hace que la trayectoria seguida por los electrones, alejándose del cátodo, sea helicoidal, lo que genera un campo eléctrico variable. Las cavidades semicilíndricas se comportan como un circuito bobina + condensador, generando una onda resonante que amplifica el campo generado

por los electrones. Alimentando el cátodo con corriente alterna se imprime una variación adicional al flujo de electrones, y la superposición de todos los efectos ofrece como resultado una radioemisión de altísima frecuencia, de microondas, cuyo valor viene determinado por las dimensiones físicas de la cavidad. La energía de microondas se emite mediante un antena de enfoque. La eficiencia de transformación energética de un magnetrón oscila entre el 60-65% y la energía restante hace que se caliente el cátodo o es eliminada por el ánodo por efecto Joule [4].

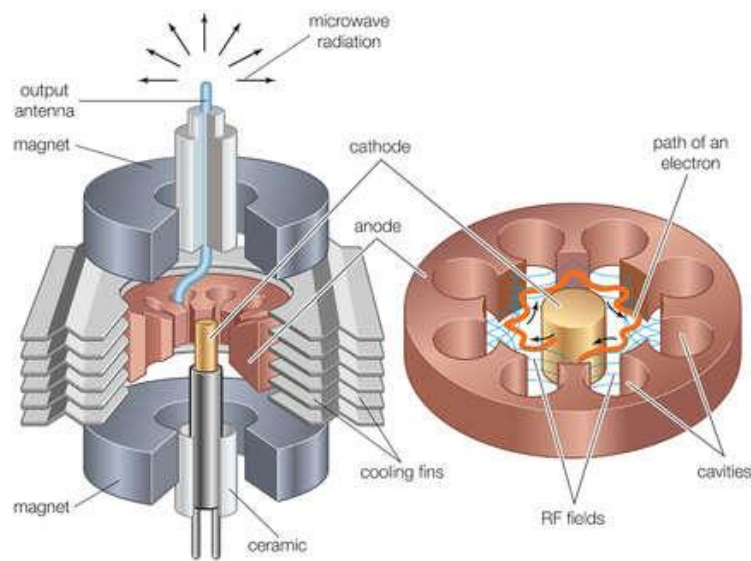


Figura II.6: Esquema de un magnetrón [26].

Sistema guía de microondas

El sistema guía está construido con un material reflectante, como planchas metálicas, cuya función es canalizar las microondas generadas por el magnetrón y dirigir las hacia la cavidad del horno de microondas.

Cuando la radiación de microondas es conducida a través del sistema guía, ésta sufre una serie de reflexiones al incidir sobre las paredes del mismo. Estas radiaciones reflejadas pueden interferir unas con otras. Con el fin de evitar una interferencia destructiva de las ondas reflejadas (oposición de fase) es necesario adecuar el diseño del sistema guía al valor de la frecuencia de la radiación de microondas generada por el magnetrón.

Sistema circulador - disipador

La función del circulador es evitar que la radiación de microondas no absorbida por la muestra sea reflejada hacia el magnetrón lo que lo puede sobrecalentar, disminuyendo la potencia generada, o incluso puede llegar a destruirlo. Es un sistema de seguridad que utiliza ferritas y campos magnéticos estáticos lo que permite el paso de las microondas solamente en una dirección (hacia la cavidad), conduciendo las ondas reflejadas hacia una masa muerta (disipador) donde la energía se disipa en forma de calor. Todos los hornos analíticos poseen este sistema de seguridad, pero no así los hornos domésticos [27].

Sistema de distribución de energía

Está constituido por unas aspas en forma de ventilador cuya misión es distribuir de forma homogénea en la cavidad la energía entrante proveniente del sistema guía. De esta forma se asegura que el calentamiento de la muestra sea independiente de la posición de ésta dentro de la cavidad.

Cavidad de microondas

La cavidad de microondas es la zona de aplicación de la radiación de microondas sobre la muestra (zona de “calefacción”). En este tipo de cavidades la distribución de la energía no es muy homogénea a pesar de la presencia del *sistema de distribución*. Para evitar que a la muestra le llegue distinta cantidad de energía según su posición en la cavidad de microondas se instala un plato giratorio (Figura II.7, [28]), encargado de mover por toda la cavidad los distintos recipientes con las muestras. De este modo se asegura un nivel de irradiación semejante para todas ellas.



Figura II.7: Fotografías de platos giratorios de hornos de microondas de la caso comercial “CEM Corporation” [28].

II.1.4. Tipos de hornos de microondas

En las últimas décadas, la creciente utilización de la energía de microondas en los laboratorios químicos ha dado lugar al desarrollo de múltiples y distintos sistemas de hornos de microondas. Clasificar los hornos de microondas es una tarea difícil debido a la variedad de sus aplicaciones y a sus diferentes diseños. En la literatura se encuentran diferentes tipos de clasificaciones según la distribución de energía en la cavidad (i.e., sistemas monomodo y multimodo), el tipo de recipientes (sistemas abiertos y cerrados – de presión), y la forma de irradiar las muestras (sistemas no focalizados y focalizados).

II.1.4.1. Sistemas cerrados (con reactores a presión) no focalizados

En los sistemas cerrados (Figura II.5) las muestras se colocan en reactores de alta presión. Dentro de dichos reactores el disolvente puede calentarse a altas temperaturas debido al aumento en la presión en el interior del reactor, con lo que se mejora la eficiencia y la velocidad de la digestión. Estos sistemas permiten el control automático de la temperatura y de la presión dentro de los reactores [2,6]. Además, en su diseño se presta una especial atención a las medidas de seguridad. La cavidad de microondas debe ser capaz de eliminar los vapores que se generan para evitar que se dañe la electrónica del dispositivo. Las puertas deben ser resistentes para soportar una posible explosión en el interior de la cavidad. Los reactores que se utilizan deben ser transparentes a la radiación de microondas. Los materiales empleados en su fabricación son normalmente policarbonato, vidrio o teflón. Generalmente llevan incorporado un sistema de seguridad, que suele ser una válvula o una membrana, para eliminar el exceso de presión que se pueda generar en su interior (Figura II.8, [29]). Además de la presión, estos sistemas permiten el control automático de la temperatura dentro de los reactores [2,6].

Los sistemas modernos permiten irradiar más de 40 reactores. Cuentan con sofisticados sistemas de control que permiten utilizar programas de calentamiento según el tipo y la cantidad de las muestras asimismo de los disolventes empleados.

La utilización de recipientes cerrados presenta las siguientes ventajas: (i) se minimizan los errores sistemáticos, (ii) se requiere menor tiempo para el tratamiento de

las muestras, y (iii) se logran menores límites de detección. Estas ventajas son debidas a que:

- No se producen pérdidas de muestra;
- No existe peligro de contaminación;
- Se logran mayores temperaturas al trabajar con mayor presión;
- Se consiguen menores costes del análisis debido al bajo consumo de reactivos, en algunos casos de elevada pureza;
- Se protege el medio ambiente.

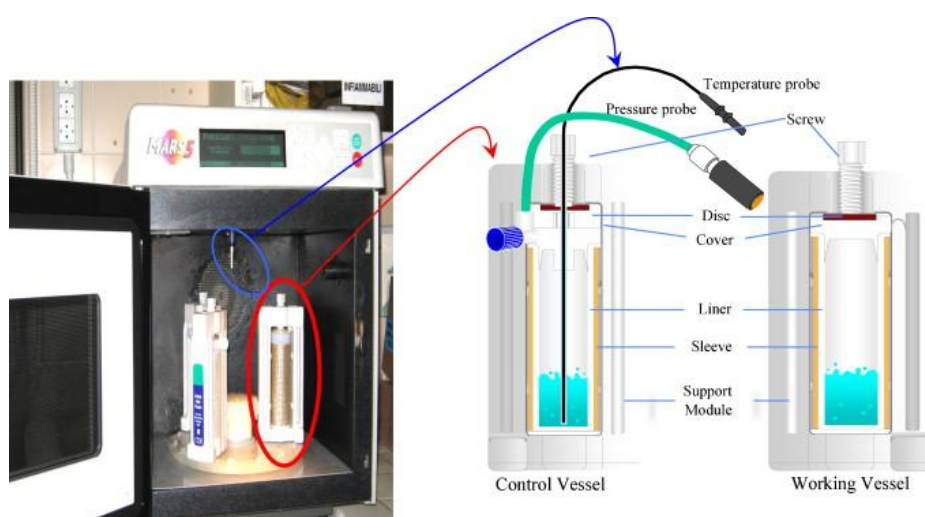


Figura II.8: Esquema de los reactores cerrados para la digestión a presión y fotografía de su colocación dentro de un horno de microondas multimodo [29].

En la última década también se han desarrollado sistemas no focalizados que emplean calentamiento por microondas a presión pero en vasos abiertos, como es el sistema UltraWave de la casa comercial Milestone. En este sistema, la cavidad de microondas se sella y se presuriza con gas inerte, el cual actúa como una “tapa” sobre las muestras, evitando una contaminación cruzada durante la digestión, A diferencia con los sistemas de digestión en vaso cerrado, con el UltraWAVE se pueden digerir al mismo tiempo matrices diferentes. Todas las muestras están bajo un control directo de la temperatura y la presión por lo que no se necesitan controles indirectos como los sensores de temperatura por infrarrojo. Esto proporciona un mayor grado de control del

proceso de digestión en todas las muestras. Además, la cámara se enfría rápidamente con agua, siendo el ciclo de trabajo mucho más corto [30].

II.1.4.2. *Sistemas abiertos focalizados*

La muestra se coloca en un recipiente abierto de vidrio o de cuarzo sobre el que se focaliza la radiación, consiguiéndose un calentamiento rápido, preciso, localizado y controlado. Estos sistemas han resultado ser muy interesantes para la extracción, disolución y síntesis de compuestos orgánicos (Figura II.9, [28]). Si bien en estos sistemas la temperatura de digestión está limitada por el punto de ebullición del disolvente utilizado a presión atmosférica, existen varias ventajas frente a la digestión en recipiente cerrado:

- No se requieren sistemas de seguridad ya que se trabaja a presión atmosférica;
- Permiten trabajar con cualquier tipo de reactivo y de recipiente (vidrio, teflón y cuarzo, entre otros);
- No existen limitaciones en cuanto al tipo de muestra;
- Es fácil de automatizar el proceso.

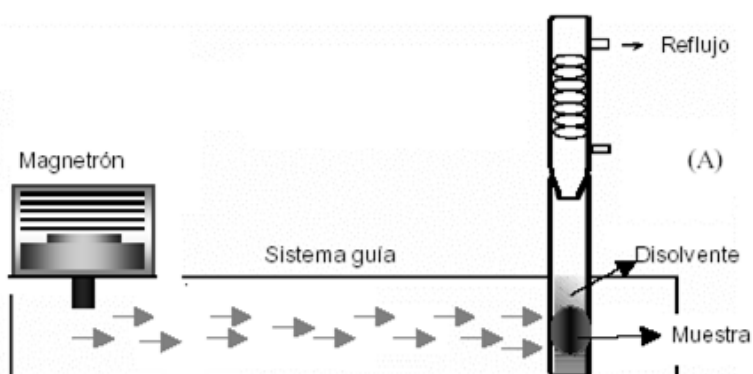


Figura II.9: Esquema de un horno de microondas focalizado [28].

II.1.4.3. *Sistemas combinados (cerrados y focalizados)*

Estos sistemas son focalizados pero emplean reactores a presión combinando así las ventajas de los sistemas cerrados y los sistemas focalizados, ya que ofrecen un

calentamiento muy rápido, debido a la focalización de la energía de las microondas sobre un reactor de presión. En general son sistemas monomodo, aunque también se han diseñado modelos que poseen un automostreador para el procesamiento secuencial automático de varias muestras (Figura II.10, [31]).

También se han utilizado sistemas más sofisticados que permiten la extracción de parte de la fase gaseosa desde de los reactores de presión de forma programada y controlable. Dichos sistemas han sido utilizados en la preparación de muestra para la determinación de mercurio y arsénico con el fin de evitar pérdidas de especies volátiles de dichos elementos durante el calentamiento por microondas o posteriormente de la apretura de los reactores a presión [32].



Figura II.10: Sistema combinado modelo Discover SP-D de la casa comercial "CEM Corporation" [31].

II.1.4.4. Hornos de microondas domésticos

Aunque no han sido diseñados para su uso en trabajos de laboratorio, este tipo de hornos se ha utilizado en una gran variedad de aplicaciones analíticas debido a su bajo coste y facilidad de manejo. La principal desventaja de este tipo de hornos es que la potencia del campo de microondas generado no es regulable ya que la variación de la potencia se consigue encendiendo y apagando cíclicamente el magnetrón [2]. A

menudo, los hornos de microondas domésticos suelen modificarse para adaptarlos a las necesidades del trabajo analítico. *En estos casos se deben tomar precauciones especiales para prevenir posibles escapes de radiación de microondas fuera de la cavidad del horno (debido a sus efectos perjudiciales para la salud), y el riesgo de explosiones [2].*

II.2. Objetivo y plan del trabajo experimental

II.2.1. Objetivo

Considerando la problemática de la determinación de platino y paladio en muestras medioambientales y las ventajas del uso de la energía de microondas en diferentes procesos de preparación de la muestra se planteó como objetivo general para el trabajo experimental:

El desarrollo y evaluación de un sistema de preconcentración y separación de paladio y platino asistido por microondas para la determinación de estos metales mediante ICP-MS.

II.2.2. Plan de trabajo

El plan de trabajo desarrollado en la presente investigación ha constado de los siguientes apartados:

- Construcción de un sistema de preconcentración y separación asistido por microondas basado en la técnica de extracción en fase sólida;
- Optimización de las variables experimentales para conseguir el máximo rendimiento del sistema (máxima preconcentración y total separación de paladio y platino de sus potenciales interferentes);
- Aplicación del método desarrollado al análisis de paladio en materiales certificados de referencia (suero y orina humanos) y de paladio y platino en muestras reales (materia particulada suspendida en el aire) mediante la técnica de ICP-MS.

II.3. Resultados experimentales: Microwave-assisted solid phase extraction prior to ICP-MS determination of Pd and Pt in environmental and biological samples

II.3.1. Introduction

Palladium (Pd) and platinum (Pt) determination has been a topic of constant interest to analytical chemists for the last two decades. This is mainly attributable to the increasing quantities of these elements in the environment, resulting from human activity [33].

The recent and extensive usage of automobile catalysts has led to an overall increase in Pd and Pt presence in urban areas with high-density traffic [34-39]. During the production, operation and recycling of these catalysts, Pd and Pt are emitted, leading to a significant increase in their concentration in various environmental samples. Increasing concentrations of these metals in human urine, related with the emission from automobile catalysts, has also been reported [40]. Until now, this anthropogenic contamination has not been considered to pose a health hazard [35,41]. However, data exist for the negative health effects produced by high levels of different Pd and Pt species [38,39] and this makes environmental monitoring of Pd and Pt an important task. On the other hand, their low concentration in natural samples combined with numerous interferences during their quantification represents a challenge for their direct determination.

Highly sensitive techniques such as ICP-MS should be used in combination with interference control approaches like the use of high-resolution instruments [37,42] and/or reaction/collision-based polyatomic interferences elimination [43,44]. On the other hand, the recent research has led to the development of numerous new analytical sample preparation strategies [45]. Different techniques for matrix separation and concentration of Pd and Pt have been applied like coprecipitation [46], liquid-liquid extraction [47], solid phase extraction (SPE), electrochemical concentration [48], biosorption [49] and bioaccumulation [36], fire assays [50,51], etc. Solid phase extraction by chelating reagents has proved to be an effective concentration method owing to its high selectivity [21,45,52,53]. However, methods often employ strong

stripping reagents (such as concentrated acidic solutions of thiourea) for quantitative elution of Pd and Pt from the chelating resins [21,53]. These could be a problem for subsequent inductively coupled plasma (ICP) spectrometric determination because of sample transport and/or spectral interferences. Assisting the elution process by external energy could overcome the problems of using aggressive or concentrated eluents. Nowadays, microwaves (MW) are widely used in analytical laboratories for different purposes like drying [9,11], ashing and fusion [2], extraction and digestion [2,7,25,54], etc. because of their fast and selective heat potential [25]. Besides this unique heating capacity, microwave radiation is also used to activate different chemical processes, owing to its interaction with the substances that absorb it [55]. For instance, microwave energy has already been applied to the acceleration of a cloud-point extraction procedure to determine Pd and Pt [18]. In another work, the combination of home-modified silica gel to retain Pt and thiourea solution for its elution under microwave radiation has been applied prior flame absorption atomic spectrometry analysis of metallurgical samples [21].

In this study a commercially available thioureido propyl functionalised silica gel was used to trap Pd and Pt from liquid samples. The analytes were then eluted using low-concentration thiourea aqueous solution. The analyte desorption process has been assisted (i.e., activated and accelerated) by microwave radiation in a domestic microwave oven. To the authors' knowledge, this is the first time this process has been applied to sample preparation of environmental and biological samples prior to ICP spectrometric determination. Further, the eluates were subjected to inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) determination. The method was used to analyse Pd in certified reference materials (CRMs) (i.e., human urine and serum) and also to analyse Pd and Pt concentration in real-world samples (i.e., airborne particulate matter).

II.3.1. Experimental

II.3.1.1. Instrumentation

The experimental system used for concentration and matrix separation of Pd and Pt is shown schematically in Figure II.10. It comprised a home-made glass microcolumn (4), placed inside the chamber of a modified domestic microwave oven (5) (Samsung 1711N, Samsung Electronics Co. Ltd., South Korea, with a maximum power of 800 W)

and connected to a peristaltic pump (3) (Perimax 16/3, SPETEC GmbH, Germany) by Teflon™ capillary tubing (0.8 mm i.d.).

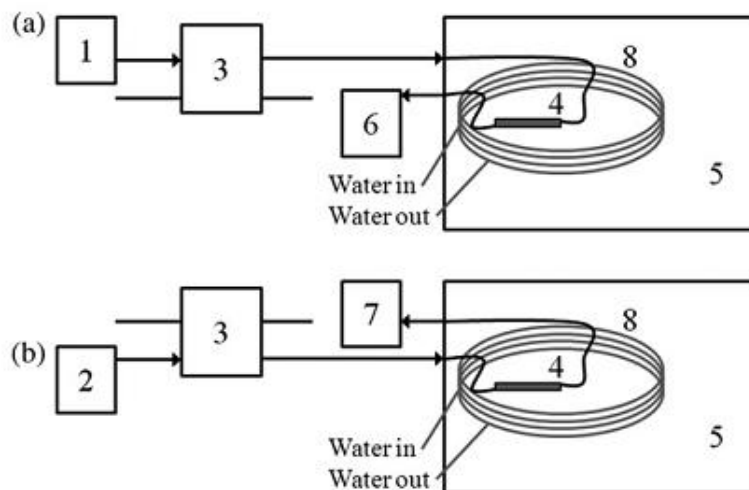


Figure II.10: Sample preparation system: (a) – sorption (loading) stage, (b) – desorption (elution) stage; 1 – sample or water, 2 – eluent or water, 3 – peristaltic pump, 4 – microcolumn for separation and concentration, 5 – domestic microwave oven, 6 – effluent recipient, 7 – eluate recipient, 8 – water cooling circuit.

The microcolumn (4) was made of a borosilicate glass tube with an internal diameter of 3mm and a total length of 40 mm. On each side of the tube a part of its wall was thickened to an internal diameter of approximately 1mm and the two sides of the column were connected to the other parts of the system. It was packed with 0.12 g of the sorbent material.

The motor used to rotate the glass plate inside the microwave oven was disabled and the plate was removed. A cooling coil of Teflon™ tube (8) having 3 mm internal diameter and 1.5 m length (approximate volume of 10 mL) was placed inside the oven and both ends were connected to the water inlet and outlet respectively through two holes made on the left-hand side of the oven's cavity. The function of the cooling coil (8) was to absorb possible excess microwave energy while the oven was operating, preventing the system from overheating and the oven's magnetron from being damaged, by the reflected MW power. **Caution: perforation of the microwave oven's chamber can lead to microwave radiation leakage with potential health risks [2].** In this study the area around the oven was frequently checked with a microwave field monitor, and no leakage was detected.

An inductively coupled plasma mass-spectrometer (Elan DRC II PerkinElmer SCIEX, PerkinElmer Life And Analytical Sciences Inc., Wellesley, MA USA) was used to determine Pd and Pt. The sample introduction system consisted of a micronebuliser (Micromist, Glass Expansion Ptr. Ltd, West Melbourne, Vic 3003, Australia), and a cyclonic spray chamber (Twister baffled, PerkinElmer Life And Analytical Sciences Inc., Wellesley, MA USA). The other operating conditions for ICP-MS determination are listed in Table II.1. Before ICP-MS measurement, 50 mL of internal standard (Rh solution, 100 mg L⁻¹) were added to the 1 mL of eluate obtained after the separation and concentration procedure.

Table II.1: ICP-MS operating conditions for Pd and Pt determination in 0.5% thiourea samples.

Parameter	Value
RF Power	1000 W
Argon flow rates:	
plasma:	15.0 L min ⁻¹
auxiliary:	1.20 L min ⁻¹
nebulizer:	1.02 L min ⁻¹
Measured isotopes	¹⁰⁵ Pd, ¹⁰⁶ Pd, ¹⁰⁸ Pd, ¹⁹⁴ Pt, ¹⁹⁵ Pt
Liquid sample uptake rate	≈ 0.3 mL min ⁻¹ (free aspiration)
Dwell time	100 ms
Points per peak	1
Number of replicates	5
Internal standard	¹⁰³ Rh (5 µg L ⁻¹)

A closed vessel microwave system (Mars Xpress, CEM Corporation, Matthews, USA) with TeflonTM TFM vessels was applied for digestion of the filters where the airborne particles were collected. The filters were glass fibre type Ø 150mm (Schleicher & Schuell Micro Science GmbH, Dassel, Germany).

II.3.1.2. Reagents

High pure water (18.2 MΩ cm) obtained by a MilliQ water system (Millipore, Bedford, MA, USA) was used throughout. The sorbent, 3-(1-thioureido)propyl functionalised silica gel was purchased from Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim, Germany). Thiourea ('pa' Merck, Darmstadt, Germany) was used to prepare the eluent solutions by dissolving weighted portions of the reagent in water. Monoelemental standard solutions of 1000 mg L⁻¹ (High Purity Standards, Charleston, England) of Pd

and Pt were used to prepare a stock solution of 1 mg L^{-1} and all the working standards were prepared daily by diluting it in 1M HCl (dilution of 30% Suprapur HCl, Merck, Darmstadt, Germany). Rh internal standard solution was obtained by appropriate dilution of 10 mg L^{-1} standard solution (Merck, Darmstadt, Germany). The cocktail standard solutions for the interferences study were obtained by diluting 1000 mg L^{-1} single element standards of Cu, Zn, Rb, Sr, Y, Zr, Cd, Hf and Pb (High Purity Standards, Charleston, England). HNO_3 (65% Analpur, Panreac, Barcelona, Spain) and H_2O_2 (30% Suprapur, Merck, Darmstadt, Germany) were used for real-sample microwave digestion.

II.3.1.3. Certified reference materials and real samples

The Pd-containing CRMs used in this work were Medisafe[®] Metals Serum control (human), level 2, and Medisafe[®] Metals Urine control (human), level 2, (Medichem, Steinenbronn, Germany). Both CRMs are provided as lyophilised samples and were reconstituted in 5 mL of water for 30 minutes prior analysis, as recommended by the manufacturer.

Airborne particulate matter samples – PM_{10} fractions (particles with diameters smaller than 10 μm), retained on quartz fibre filters were analysed as real samples. The samples were collected at automatic monitoring stations in urban areas in the province of Alicante (Spain). Each filter collected the particulate matter from 720 m^3 of air, according to the Spanish legislative procedures for this type of sampling. The sample-containing filters were provided and digested according to the internal procedure of the laboratory of public health at the public health center of Alicante (Spain). The filter, 10 mL 65% HNO_3 and 1.5 mL 30% H_2O_2 were mixed inside the Teflon[™] vessel and subjected to microwave digestion. The temperature programme of the microwave system was set as follows: control type – ramp to temperature; maximum power – 100% (1600 W); ramp time – 23 min; maximum temperature – 195°C ; hold on T_{max} – 15min. After this the solutions were filtered, 5 mL of 30% HCl were added to obtain stable conditions for Pd and Pt and the sample was diluted up to a final volume of 50 mL.

II.3.1.4. Procedures

II.3.1.4.1. Microcolumn packing and conditioning

Before being packed with the sorbent, the microcolumn was cleaned with 3% HNO₃ solution for 12 h, rinsed with water, and left to dry. Afterwards, a previously weighed quantity of 0.12 g of the sorbent was placed inside it, in the space between the two thickened parts, where two wads of glass wool were inserted in order to prevent the sorbent from being washed out by the liquid flow. Any possible residues in the sorbent were removed and the microcolumn was conditioned by washing consecutively with flows of 1 M HCl solution and 4% thiourea solution at a flow of 1 mL min⁻¹ and for one hour each. After a final rinsing step, with water, to remove HCl and thiourea residues, the microcolumn was considered ready for the concentration and sample matrix separation of Pd and Pt. Once prepared and conditioned, the column was used for the concentration and separation procedure for at least 100 cycles; it was re-packed only when damaged or if a significant change in the colour of the sorbent was observed.

II.3.1.4.2. Concentration and matrix separation of Pd and Pt

The sample preparation procedure involved two stages (Figure II.10): (a) analyte sorption on the sorbent (Figure II.10 (a)) and (b) analyte elution with thiourea solution under microwave irradiation (Figure II.10 (b)). After each stage the system was washed with water. The duration of the stages and the washing intervals between them are listed in Table II.2.

Table II.2: Experimental conditions for Pd and Pt concentration and matrix separation procedure.

Stage	Condition	Solution flowing through the microcolumn	Flow rate, mL min ⁻¹	Duration, min	Microwave oven status
Sorption		Sample	3	depends on the sample volume	Off
Washing		Water	2	2	Off
Elution		Eluent (0.5% thiourea)	0.5	2	On
Washing		Water	2	2	Off

During the sorption stage (Figure II.10 (a)) the sample (1), driven by the peristaltic pump (3) at a flow rate of 3 mL min⁻¹, passed through the microcolumn (4) where the

Pt and Pd ions were sorbed by the 3-(1-thioureido)propyl functionalised silica gel. The effluent containing only the sample matrix was collected after the microcolumn in the container (6), located outside the microwave oven (5).

After the sample, 4 mL of water was pumped at 2 mL min^{-1} through the microcolumn (4) in order to wash out the sample matrix and the remaining acid.

During elution (Figure II.10 (b)), 1 mL of 0.5% thiourea solution (2) was pumped at 0.5 mL min^{-1} through the microcolumn (4) and while the MW oven (5) was turned on. Thus, Pd and Pt were quantitatively eluted from the microcolumn and this process was accelerated by the microwave field. The eluate was collected in a plastic vial (7) outside the microwave oven (5). Both the eluent (2) and the eluate (7) were weighed before and after the procedure in order to correct for losses in the microcolumn. Then 50 mL of 100 mg L^{-1} internal standard (Rh) were added to the 1 mL of eluate.

At the end of the procedure, a second washing step was performed with water for 2 min.

II.3.2. Results and discussion

II.3.2.1. Sorption

The commercially available 3-(1-thioureido)propyl functionalised silica gel was used for the quantitative trapping of Pd and Pt. Thiourea derivatives and thiourea-group containing polymers are often used for Pd and Pt extraction [56-59]. The initial sample acidity, sample flow rate through the microcolumn and column capacity were studied and optimised to achieve quantitative sorption of the analytes.

II.3.2.1.1. Sample acidity

The complexation of Pd and Pt with organic ligands is usually carried out in hydrochloric acid media. The influence of sample acidity was evaluated using model solutions with a constant concentration of Pd and Pt and different HCl content. Samples of 1 mL of 200 mg L^{-1} of Pd and Pt in the media of 0.01 – 4 M HCl were passed through the column at flow rate 1 mL min^{-1} , and the effluents were collected and measured by ICP-MS. The residual quantities of Pd and Pt were then compared with

those of the initial samples and the percentages of analyte retention were calculated. The results highlight that both Pd and Pt were quantitatively (more than 99%) retained in the microcolumn for a wide range of acidities – between 1 M and 4 M HCl (Figure II.11). Finally, 1 M HCl was chosen as optimum because it ensures a quantitative retention of analytes under soft conditions, preventing the sorbent from strong acid.

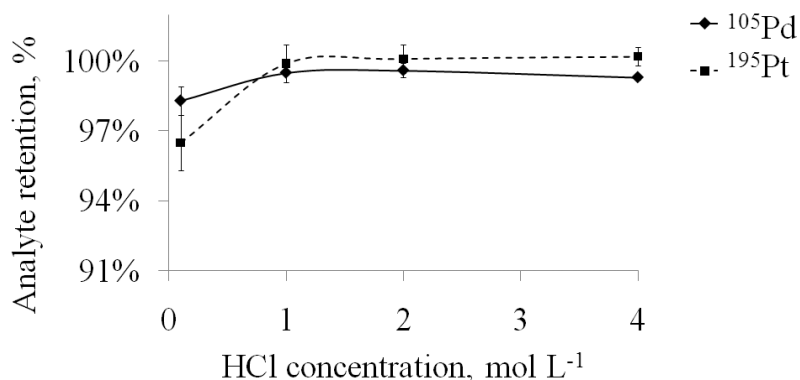


Figure II.11: Effect of sample acidity on analyte retention. Volume of model solutions: 1 mL; concentration of Pd and Pt: 200 $\mu\text{g L}^{-1}$; sample flow rate: 1 mL min⁻¹.

II.3.2.1.2. Sample flow rate

Samples of same volume and concentration were pumped through the microcolumn using different flow rates and the residual ICP-MS signals of Pd and Pt in the effluents were compared against those of the original sample solution. Flow rates between 0.5 and 3 mL min⁻¹ were evaluated. Flow rates higher than 3 mL min⁻¹ increased the overall pressure inside the system causing leakage and instability of its functioning. For all the flows studied, the Pd and Pt sorption rate exceeded 99%. Thus, the highest possible sample flow rate of 3 mL min⁻¹ was selected in order to minimise the overall time of sample preparation.

II.3.2.1.3. Column capacity

To evaluate the capacity of the microcolumn to retain the analytes quantitatively, 100 mL solution of Pd and Pt with a concentration of 500 mg L⁻¹ each was passed through the microcolumn (a total quantity of 50 mg for each element) at a flow rate of 3 mL min⁻¹. Every 3 min, portions of approximate 1 mL of effluent were collected at the end

of the column, measured on ICP-MS and the residual levels of Pd and Pt were compared to those in the original sample. For all the portions, the analyte retention level exceeded 99%. No further studies were made in this respect since the proven capacity (up to 50 mg Pd and Pt) of the column is much higher than the concentrations expected in environmental samples.

II.3.2.2. Elution

II.3.2.2.1. Microwave field effect

Thiourea solutions are commonly used to elute Pd and Pt from different sorbents owing to their ability to form complexes with these metals [49,53,56]; however, a high temperature is often required to accelerate the desorption processes in order to obtain good analyte recoveries [53,59]. Microwaves have proven to be a fast and selective heating source. Thus, in this work microwave radiation was used to heat the thiourea solution quickly and selectively, accelerating the Pd and Pt desorption, aiming to use low eluent volume and concentration, and to obtain high concentration factors. To evaluate the effect of microwave radiation on the elution stage, samples of 1 mL containing 1 mg L⁻¹ of Pd Pt and 1 M HCl were passed through the column at a flow rate of 1 mL min⁻¹. Afterwards, elution was carried out with 1 mL 0.5% of thiourea solution at 1 mL min⁻¹.

In order to study the effect of MW irradiation on desorption efficiency, the experiment was first done without, and then done with, microwave heating in the elution step. The signals for the Pd and Pt isotopes in the eluates were measured by ICP-MS and compared to those obtained for a model sample of 1 mg L⁻¹ Pd and Pt, in 0.5% thiourea, calculating the recovery percentage. The results in Figure II.12 show that under these experimental conditions, the recovery of both Pd and Pt was incomplete (around 65% and 49%, respectively) when microwave heating was not applied. However, the application of high-energy microwave field led to a higher level of analyte desorption. This gave higher analyte recoveries – 81% for Pd and 76% for Pt (and, thus, higher factors of concentration). This positive effect could be attributable to the fast increase in the temperature of the thiourea solution during the elution step, caused by the microwave field. Furthermore, it was also observed that the sorbent material, the

microcolumn walls and all the connections and tubing did not absorb microwave radiation. Hence sorbent decomposition due to overheating was prevented. As well as the heating effect, an additional non-thermal increase in elution efficiency may have been caused by the microwave field since microwaves are known to activate different chemical processes, including complex formations [55].

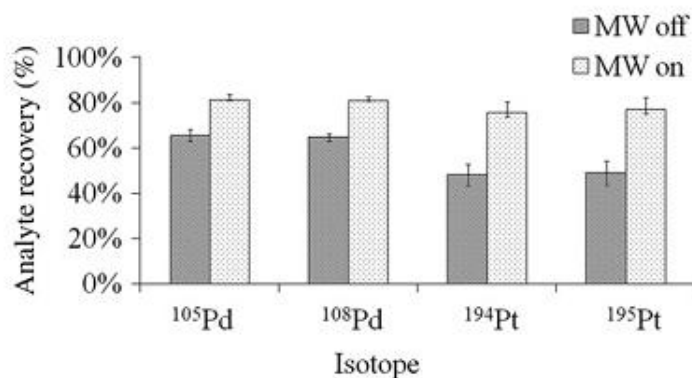


Figure II.12: Effect of microwave radiation application on analyte recovery. Volume of model solutions: 1 mL; concentration of Pd and Pt: 1 mg L⁻¹ (1 M HCl); volume of thiourea solution: 1 mL; thiourea concentration: 0.5%; elution flow rate: 1 mL min⁻¹.

Other experimental factors such as microcolumn positioning inside the microwave oven, eluent concentration and flow rate were also studied in order to obtain the maximum elution efficiency.

II.3.2.2.2. Microcolumn positioning inside the microwave oven

It is well known that microwave field intensity inside domestic-oven cavities is not uniform [2]. Hence, it is critical to choose the right spot to place the microcolumn. The field-power distribution inside the cavity was evaluated by comparing volumes of water that had evaporated from 25 different containers after 3 min of microwave irradiation inside the oven chamber. This experiment confirmed the literature data since important differences in field intensity were observed. In this case the maximum power zone was located next to the left-hand-side wall. Therefore, the microcolumn was placed in this position.

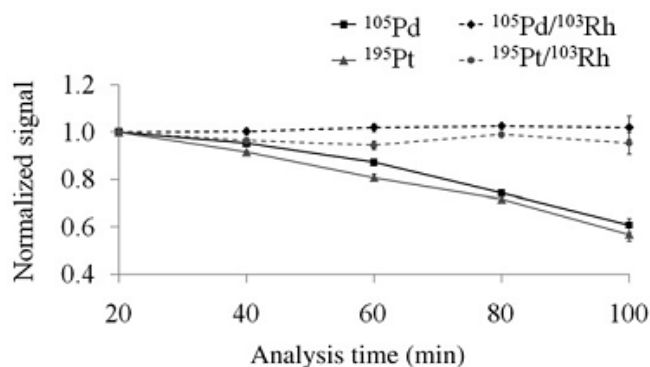


Figure II.13: Effect of thiourea content on the ICP-MS signal over time. Concentration of Pd and Pt 20 mg L^{-1} (in 1% thiourea solution); concentration of the internal standard (Rh): 5 mg L^{-1} . Normalised signals: signals relative to the starting ones.

II.3.2.2.3. Eluent concentration

Preliminary studies with model solutions showed that using thiourea solutions with concentrations higher than 1% cause a very rapid drop in ICP-MS instrument sensitivity over time owing to analyte mass transport interferences. Closer visual inspection revealed that high levels of thiourea led to its deposition on the hot end of the ICP torch injector tube and over the surface of the cones. However, using solutions of 1% (or lower) in combination with longer washing times between samples reduced the signal drift to a level that could be compensated with a proper internal standard (Figure II.13). On the other hand, thiourea concentration affects analyte desorption efficiency hence this parameter must be optimised. The analytes from samples of equal volume (1 mL) and analyte concentration (20 mg L^{-1}) were retained in the column and then eluted with thiourea solutions of 1 mL and concentrations between 0.1% and 1.2%. As shown in Figure II.14, the level of elution increased in the thiourea concentration range 0.1–0.5%, after which it remained relatively constant. Although the use of higher thiourea concentrations resulted in slightly higher analyte elution, finally a concentration of 0.5% thiourea solution was chosen as a compromise between elution efficiency and the thiourea deposition problems described above.

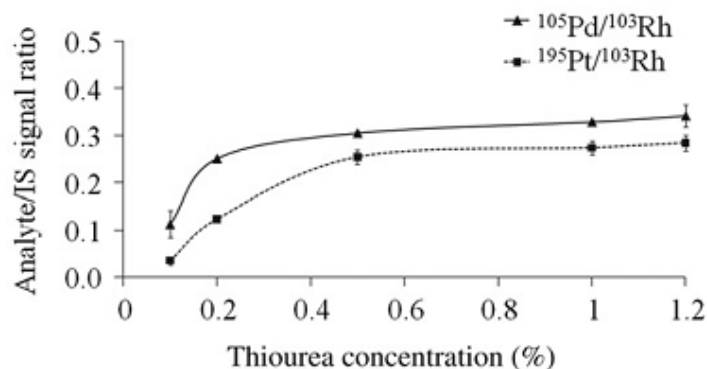


Figure II.14. Effect of thiourea concentration on desorption. Volume of model solutions: 1 mL; concentration of Pd and Pt: 20 mg L^{-1} (1 M HCl); internal standard (Rh): 5 mg L^{-1} ; volume of thiourea solutions: 1 mL; elution flow rate: 1 mL min^{-1} .

II.3.2.2.4. Eluent flow rate

Eluent flow rate through the microcolumn mainly influences elution time and the temperature that the eluent reaches under the microwave radiation (the latter effect is less pronounced because heating is very fast). Lower flow rates increase the residence time of the thiourea solution inside the microcolumn and its temperature, which is favourable for the desorption level. Nevertheless, under low flow rates, the strong microwave field could heat the eluent solution up to its boiling point. In this case, the peristaltic pump would not be able to overcome the backpressure of the gases formed inside the microcolumn. Thus the influence of the eluent flow rate in the range of $0.5\text{--}2.0 \text{ mL min}^{-1}$ was studied to ensure a maximum residence time of the eluent inside the column without overheating the system. As expected the signals increased on decreasing the thiourea solution flow rate, this being more pronounced for Pt. Figure II.15 shows graphs of the results obtained for both analytes. The most suitable value of the eluent flow rate was found to be 0.5 mL min^{-1} . Lower flow rates were not tested owing to the reasons mentioned above.

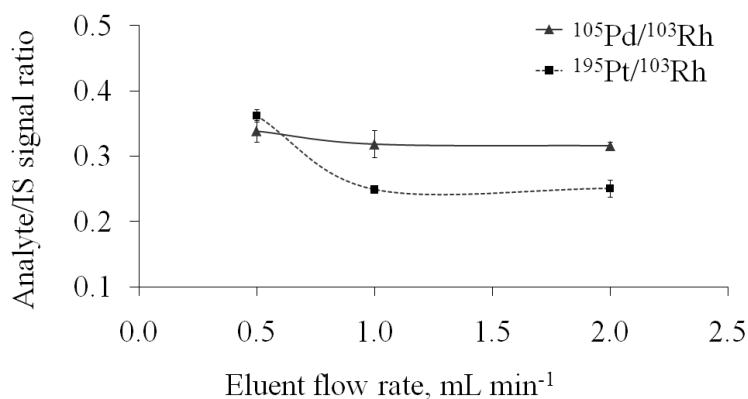


Figure II.15. Effect of eluent flow rate on the elution. Volume of model solutions: 1 mL; concentration of Pd and Pt: $20 \mu\text{g L}^{-1}$ (1 M HCl); internal standard (Rh): $5 \mu\text{g L}^{-1}$; volume of thiourea solutions: 1 mL; thiourea concentration: 0.5%.

II.3.2.3. ICP-MS determination

II.3.2.3.1. Nebuliser feeding

When a peristaltic pump was used to feed the sample into the nebuliser a strong drift in the signals of the Pd isotopes was observed (Figure II.16). However, the drift disappeared when the nebuliser was fed by free aspiration, leading to the conclusion that there was sorption of Pd thiourea complexes on the walls of the peristaltic-pump tubes that caused the drift. Therefore, free aspiration feeding (i.e., around 0.3 mL min^{-1}) was used during analyte determination.

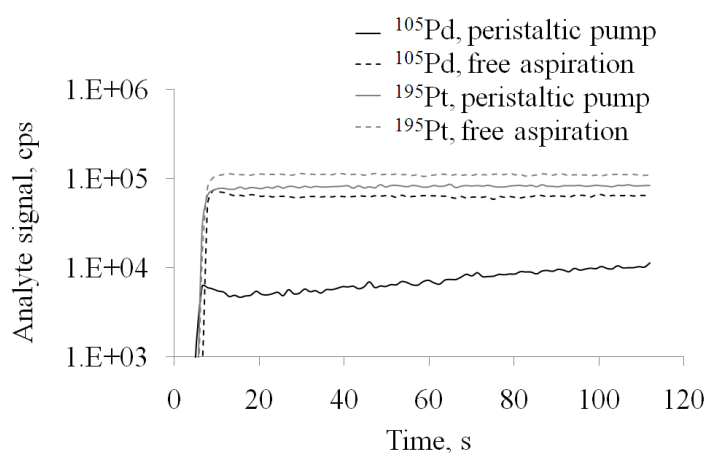


Figure II.16: ICP-MS signal drift for Pd and Pt isotopes. Model solution of Pd and Pt, ($20 \mu\text{g L}^{-1}$ each) in 0.5% thiourea.

II.3.2.3.2. Internal standard

Different elements were tested as potential internal standards. Among them Rh showed the most similar to Pd and Pt ICP-MS behaviour in the thiourea solution (Figure II.13). Others, such as In, Te and Re were found to be less efficient. In real environmental samples, Rh is normally present together with Pd and Pt, so its presence might be expected to cause hampering. But in this experiment, under the conditions of sorption and elution established, Rh recovery in the eluate was less than 1% (Table II.3). Thus, this element was totally separated from the analytes in the sample matrix during the concentration and separation step. This allowed Rh to be used as internal standard if added to the eluate (Figure II.13).

Table II.3: Elimination efficiency of the main interfering elements.

Interferent	Elimination efficiency, %	Interferent	Elimination efficiency, %
Cu	30.1 ± 1.0	Zr	> 99
Zn	88.7 ± 1.7	Cd	85.7 ± 2.6
Rb	> 99	Hf	> 99
Sr	> 99	Pb	87.3 ± 1.4
Y	> 99	Rh	> 99

± Relative standard deviation (n=3)

II.3.2.4. Method performance

II.3.2.4.1. Matrix separation efficiency

To assess the selectivity of the 3-(1-thioureido)propyl functionalised silica gel, model solutions of 1 mL containing 100 mg L⁻¹ of Cu, Zn, Rb, Sr, Y, Zr, Cd, Hf and Pb (known to cause spectral interferences in Pd and Pt ICP-MS determination [33]) were subjected to the separation and concentration procedure under the above-described optimised conditions. The interferent elements recoveries were calculated by comparing their ICP-MS signals in the eluates with those of a 100 mg L⁻¹ standard solution of the same elements, prepared in 0.5% thiourea in order to match the eluate matrix. The elimination efficiency percentage (defined as ‘100 – interferent recovery %’) results for these elements are given in Table II.3. The majority of the isotopes causing spectral

interference were quantitatively separated. In the eluates there was still presence of Cu (eliminated at around 30%), and also smaller quantities of Zn, Pb and Cd for which elimination efficiency was between 86% and 89%. The Cd isotopes 106, 108 and 110 caused isobaric interference to the Pd 106, 108 and 110 isotopes, thus for samples with high Cd contents use of the 105 Pd would be more appropriate. The relatively low level of Cu elimination from the matrix could also cause it to compete with analytes during elution, leading to incomplete Pd and Pt recovery. Thus, the influence of Cu on analyte recovery was evaluated. Samples of 1 mL containing Pd and Pt (10 mg L^{-1}) and without and with additionally added 1 mg Cu L^{-1} were subjected to the separation and concentration procedure and the ICP-MS and the Pd and Pt isotope signals were compared in both. The average signal suppression for Pd and Pt isotopes due to the competitive presence of Cu was around 2–4%, similar to the precision intervals of the replicates, which makes it statistically indistinctive.

II.3.2.4.2. Analytical figures of merit

The figures of merit were characterised by the analyte recovery percentage, concentration factor, methodological limit of detection, method repeatability (RSD%, $n = 3$) and calibration regression equations for both analytes. These were determined for samples to eluate volume ratios between 1 and 100. The results obtained are listed in Table II.4. Five series of model samples of 1 mL of 10 mg L^{-1} Pd and Pd in 1 M HCl were diluted with 0, 9, 19, 49 and 99 mL of 1 M HCl solution (dilution factor 0, 10, 20, 50 and 100, respectively) and subjected to sample preparation and determination procedures. Separately, 10 mg L^{-1} Pd and Pd solution was prepared directly in 0.5% thiourea solution as a reference. After the ICP-MS measurements of the eluted samples and the reference, the analyte recoveries were calculated. For the samples diluted up to 50 times, analyte recovery percentage values of about 93.0–105.4% were obtained. The model samples diluted 100 times showed slightly lower analyte recoveries (89.9% for Pd and 92.3% for Pt).

The concentration factors were calculated by dividing the sample to eluate volume ratios by their corresponding analyte recovery values. The highest concentration factors obtained were 89.9 and 92.3 for Pd and Pt, respectively.

The regression equations and the methodological limits of detection (LOD) were obtained by internal calibration. Blank solution and six calibration standards in

concentration ranged between 50 and 2500 ng L⁻¹ prepared in 0.5% thiourea were used. The corresponding regression equations for both analytes were as follows: $y = (0.0375 \pm 0.0004)x - (0.0001 \pm 0.0006)$ for ¹⁰⁵Pd isotope and $y = (0.0552 \pm 0.0007)x - (0.0002 \pm 0.0009)$ for ¹⁹⁴Pt isotope. LOD for 1:1 sample to eluate volume ratio were calculated after the regression equations using the 3σ criteria. The LOD values for the rest of the sample to eluate volume ratios were obtained by dividing the corresponding concentration factors.

Table II.4: Analytical figures of merit.

Isotope	Sample to eluate volume ratio	Recovery, %	Concentration factor	LOD ¹ , ngL ⁻¹	RSD ² , %
¹⁰⁵ Pd	1 : 1 ³	98.4	1.0	18.3	1.5
	10 : 1	96.7	9.7	1.9	1.6
	20 : 1	93.0	18.6	1.0	1.3
	50 : 1	95.7	47.9	0.4	4.0
	100 : 1	89.9	89.9	0.2	2.8
¹⁹⁴ Pt	1 : 1 ⁴	99.8	1.0	19.9	2.4
	10 : 1	99.1	9.9	2.0	1.5
	20 : 1	105.4	21.1	0.9	2.2
	50 : 1	98.6	49.3	0.4	3.2
	100 : 1	92.3	92.3	0.2	11.0

¹Methodological limit of detection.

²Relative standard deviation ($n = 3$).

³Regression equation: $y = (0.0375 \pm 0.0004)x - (0.0001 \pm 0.0006)$; $R^2 = 0.9992$ ($N = 7$).

⁴Regression equation: $y = (0.0552 \pm 0.0007)x - (0.0002 \pm 0.0009)$; $R^2 = 0.9990$ ($N = 7$).

Table II.5 shows comparison between the LOD values obtained by the procedure described here and other recently reported methods for ICP-MS determination of Pd and Pt. As can be seen, the method proposed here provides slightly lower limits of detection than the previously published methods.

Method repeatability, expressed as RSD% of three samples consecutively subjected to the separation-concentration procedure, ranged between 1.3% and 4.0% for Pd and 1.5 and 3.2% for Pt (except for sample to eluate volume ratio of 100, where it is 11.0%).

Table II.5: LOD values comparison with other recently reported methods for ICP-MS determination of Pd and Pt.

Preconcentration method	Detection technique	Sample type	LOD	Ref.
None	ICP-MS	Environmental materials	Pd: 0.015 ng g ⁻¹ Pt: 0.015 ng g ⁻¹	[60]
Tellurium co-precipitation	ICP-MS	(i) Airborne particulate matter; (ii) road dust	(i) Pd: 0.6 pg m ⁻³ (i) Pt: 0.3 pg m ⁻³ (ii) Pd: 1 ng L ⁻¹ (ii) Pt: 1 ng L ⁻¹	[46]
On-line preconcentration with PTFE knotted reactor	ICP-(TOF)MS	Urine, serum and road dust	Pd: 0.36 ng L ⁻¹ Pt: 0.54 ng L ⁻¹	[56]
Online solid phase extraction	ICP-MS	Urine	Pd: 0.4 ng L ⁻¹ Pt: 0.9 ng L ⁻¹	[61]
Microwave assisted cloud point extraction	ICP-MS	Pharmaceutical products	Pd: 5 ng L ⁻¹ Pt: 6 ng L ⁻¹	[18]
Microwave-assisted solid phase extraction	ICP-MS	Environmental and biological samples	Pd: 0.2 ng L ⁻¹ Pt: 0.2 ng L ⁻¹	This work

II.3.2.5. Analyses of real samples and certified reference materials

Method accuracy was tested using two Pd-containing CRM samples. After their reconstitution, the samples were subjected to the concentration and separation procedure without previous dilution. The analysis results are shown in Table II.6. For the urine CRM, recovery was low (around 46%). In order to determine the reason for this, the ICP-MS signals of the Pd isotopes in the effluents were compared to those in an unprocessed reference sample. The results of this comparison revealed that around 50% of the Pd content in the urine sample was not retained by the sorbent, and this, rather than an incomplete desorption was the reason for the low recovery. In order to improve the analyte retention the urine samples were acidified with HCl (to the optimum concentration of 1 M) before the extraction procedure. This improved the sorption level and, consequently, the analyte recovery up to 84% (Table II.6), leading to overlapping between the found and the certified concentration intervals.

Table II.6: Pd concentration in CRMs.

Urine			Serum	
Found ¹		Certified ²	Found ¹	Certified ²
Without acidification	Acidified to 1 M HCl	38.0–62.0	Without acidification	40.15–69.85
22.5–23.5	39.7–44.6		48.9–49.9	

¹Interval of mean result \pm 2 standard deviation ($n = 3$; SD of the measured concentrations of three sub-samples of the same CRM), in mg L^{-1} , for ¹⁰⁵Pd isotope.

²Confidence range in force – double standard deviation of the desired value determination through the laboratories, in mg L^{-1} (as stated in the certificate).

On the other hand, for the serum CRM the results concentration interval and the certified concentration interval did overlap, indicating a very good method accuracy of around 90%.

Samples of urban airborne particles collected on quartz fibre filters were microwave digested and subjected to the sample concentration and separation procedure and ICP-MS determination discussed above. Filter blanks were also analysed, and the levels of Pd and Pt in the clean filters were found to be below the limits of detection. Rh recovery from filter blanks spiked with 20 mg L^{-1} was also checked and was found to be less than 1%. After obtaining the measurement results, the concentration of Pd and Pt in PM_{10} airborne particles was calculated in pg m^{-3} in accordance with the dilution factors. The results are shown in Table II.7. Special attention was paid to the isotope ratios obtained by the analytical signals in order to evaluate possible matrix interferences. For Pd, higher concentrations were obtained for its 106 and 108 isotopes than for the 105 isotope. This might be attributable to the above-mentioned isobaric interference caused by the presence of Cd in the samples. The analysis results correspond to previously published data for similar types of determination [62]. Levels of Pd were found to exceed those of Pt in all the samples. A possible explanation for this could be the current trend produce Pd-rich converters, which are cheaper and less sensitive to catalytic poisons than their Pt counterparts [38].

II.3.3. Conclusions

In this work, microwave energy was applied for the first time for acceleration of the elution process of trace levels of Pd and Pt in environmental and biological samples. The consequent enhancement in elution rate allows quantitative recovery of the sorbed

analytes using low eluent volumes. The sample preparation method developed in this study is robust, cheap and environmentally friendly. The majority of the elements interfering with ICP-MS are efficiently separated, with the exception of Cu, and to a lesser extent Cd, Zn and Pb. The high concentration factors obtained enabled very low limits of detection to be achieved. CRM analyses show that the method might also be applicable to the analysis of human serum and urine. The airborne particulate matter analyses were with good agreement with literature data published for similar types of determination.

Table II.7: Pd and Pt concentration in PM₁₀ airborne particulate matter¹.

Sample	1	2	3	4
Isotope				
¹⁰⁵ Pd	12.9 ± 0.5	9.5 ± 0.2	8.1 ± 0.2	11.9 ± 0.3
¹⁰⁶ Pd	13.9 ± 0.3	12.8 ± 0.2	10.7 ± 0.3	13.7 ± 0.3
¹⁰⁸ Pd	13.1 ± 0.3	12.2 ± 0.4	10.1 ± 0.3	13.0 ± 0.5
¹⁹⁴ Pt	1.2 ± 0.1	2.1 ± 0.2	2.1 ± 0.2	3.2 ± 0.3
¹⁹⁵ Pt	1.1 ± 0.1	2.1 ± 0.2	2.0 ± 0.2	3.3 ± 0.2

¹In pg m⁻³ ± standard deviation (n = 5; SD of five instrument replicates of the same real sample).

II.4. Referencias

- [1]. <http://www.astrofiscayfisica.com/>, 2013.
- [2]. H.M. Kingston y S.J. Haswell, *Microwave-enhanced chemistry fundamentals, sample preparation and applications*, American Chemical Society, 1997.
- [3]. S. Mitra (ed.), *Sample preparation techniques in analytical chemistry*, John Wiley and Sons Ltd., 2003.
- [4]. A. Zlotorzynski, *The application of microwave radiation to analytical and environmental chemistry*, Crit. Rev. Anal. Chem., 1995, **25**, 43.
- [5]. D. Ardilla, R. Oliver y F. Eestrany, *La química de la radiación de microondas*, Técnica Industrial, 2009, **284**, 55.
- [6]. C. Cámara, P. Fernández, A. Martín-Esteban, C. Pérez-Conde y M. Vidal, *Toma y tratamiento de muestras*, Síntesis, 2002.
- [7]. I.V. Kubrakova, *Microwave radiation in analytical chemistry: The scope and prospects for application*, Rus. Chem. Rev., 2002, **71**, 283.
- [8]. I.V. Kubrakova y E.S. Toropchenova, *Microwave sample preparation for geochemical and ecological studies*, J. Anal. Chem., 2013, **68**, 524.
- [9]. P.A. Tanner y L.S. Leong, *Microwave vacuum drying of marine sediment: determination of moisture content, metals and total carbon*, Anal. Chim. Acta, 1997, **342**, 247.
- [10]. Q. Jin, F. Liang, H.i. Zhang, L. Zhao, Y. Huan y D. Song, *Application of microwave techniques in analytical chemistry*, Trends Anal. Chem., 1999, **18**, 479.
- [11]. B. Maichin, P. Kettisch y G. Knapp, *Investigation of microwave assisted drying of samples and evaporation of aqueous solutions in trace element analysis*, Fresenius J. Anal. Chem., 2000, **366**, 26.
- [12]. E.M. de Moraes, J.S. Barinc, J.N. Gottfried, J.A. Medeiros y G. Knapp, *Microwave-assisted sample combustion: A technique for sample preparation in trace element determination*, Anal. Chem., 2004, **76**, 3525.
- [13]. M.F. Mesko, D.P. de Moraes, J.S. Barin, V.L. Dressler, G. Knapp y E.M. de Moraes, *Digestion of biological materials using the microwave-assisted sample combustion technique*, Microchem. J., 2006, **82**, 183.

- [14]. T.J. Brown y C.A. Kinney, *Rapid lab-scale microwave-assisted extraction and analysis of anthropogenic organic chemicals in river sediments*, Int. J. Geosci., 2011, **2**, 267.
- [15]. G.D. Matos, E.B. dos Reis, A.C.S. Costa y S.L.C. Ferreira, *Speciation of chromium in river water samples contaminated with leather effluents by flame atomic absorption spectrometry after separation/preconcentration by cloud point extraction*, Microchem. J., 2009, **92**, 135.
- [16]. N.N. Meeravali y S.-J. Jiang, *Microwave assisted mixed-micelle cloud point extraction of Au and Tl from environmental samples without using a chelating agent prior to ICP-MS determination*, J. Anal. At. Spectrom., 2008, **23**, 1365.
- [17]. M. Niemelae, S.M. Huttunen, S.S. Gornostayev y P. Peraemaeki, *Determination of Pt from coke samples by ICP-MS after microwave assisted digestion and microwave assisted cloud point extraction*, Microchim. Acta, 2009, **166**, 255.
- [18]. K. Simitchiev, V. Stefanova, V. Kmetov, G. Andreev, N. Kovachev y A. Canals, *Microwave-assisted cloud point extraction of Rh, Pd and Pt with 2-mercaptobenzothiazole as preconcentration procedure prior to ICP-MS analysis of pharmaceutical products*, J. Anal. At. Spectrom., 2008, **23**, 717.
- [19]. N.N. Meeravali y S.-J. Jiang, *Interference free ultra trace determination of Pt, Pd and Au in geological and environmental samples by inductively coupled plasma quadrupole mass spectrometry after a cloud point extraction*, J. Anal. At. Spectrom., 2008, **23**, 854.
- [20]. O. B. Mokhodoeva, A. V. Nikulin, G. V. Myasoedova y I.V. Kubrakova, *A new combined ETAAS method for the determination of platinum, palladium, and gold traces in natural samples*, J. Anal. Chem., 2012, **67**, 531.
- [21]. P. Liu, Q. Pu, Z. Hu y Z. Su, *On-line preconcentration and separation of platinum using thiourea modified silica gel with microwave assisted desorption for FAAS determination*, Analyst, 2000, **125**, 1205.
- [22]. K.K. Chee, M.K. Wong y H.K. Lee, *Microwave-assisted solvent elution technique for the extraction of organic pollutants in water*, Anal. Chim. Acta, 1996, **330**, 217.
- [23]. H.Wang, Y. Zhou, Y. Zhao, Y. Ning, X. Chen y Z. Hu, *Kinetic determination of ruthenium by on-line microwave flow injection analysis*, Anal. Lett., 2000, **33**, 2075.

- [24]. J.L. Luque-Garcia y M.D. Luque de Castro, *Where is microwave-based analytical equipment for solid sample pre-treatment going?*, Trends Anal. Chem., 2003, **22**, 90.
- [25]. H.M. Kingston y L.B. Jassie, *Introduction to microwave sample preparation, theory and practice*, American Chemical Society, 1988.
- [26]. <http://www.fayerwayer.com/2011/05/el-magnetron-y-el-horno-microondas-viva-el-ingenio/>, Betazeta Networks S.A., 2013.
- [27]. J. Astigarra, *Hornos de alta frecuencia y microondas*, McGraw-Hill Education, 1995.
- [28]. <http://www.cem.com>, CEM Corporation, 2013.
- [29]. M. Mazzarino, S. Riggi, X. de la Torre y F. Botrè, *Speeding up the process urine sample pre-treatment: Some perspectives on the use of microwave assisted extraction in the anti-doping field*, Talanta, 2010, **81**, 1264.
- [30]. <http://www.milestonesci.com/ultrawave.html>, Milestone Inc., 2013.
- [31]. <http://cem.com/content-cat657.html>, CEM Corporation, 2013.
- [32]. O.A. Tyutyunnik, M.L. Getsina, E.S. Toropchenova y I.V. Kubrakova, *Microwave preparation of natural samples to the determination of mercury and other toxic elements by atomic absorption spectrometry*, J. Anal. Chem., 2013, **68**, 377.
- [33]. M. Moldovan, *Origin and fate of platinum group elements in the environment*, Anal. Bioanal. Chem., 2007, **388**, 537
- [34]. M. Moldovan, M.A. Palacios, M.M. Gómez, G. Morrison, S. Rauch, C. McLeod, R. Ma, S. Caroli, A. Alimonti, F. Petrucci, B. Bocca, P. Schramel, M. Zischka, C. Pettersson, U. Wass, M. Luna, J.C. Saenz y J. Santamaria, *Environmental risk of particulate and soluble platinum group elements released from gasoline and diesel engine catalytic converters*, Sci. Total Environ., 2002, **296**, 199.
- [35]. B. Gómez, M.A. Palacios, M. Gómez, J.L. Sanchez, G. Morrison, S. Rauch, C. McLeod, R. Ma, S. Caroli, A. Alimonti, F. Petrucci, B. Bocca, P. Schramel, M. Zischka, C. Peterson y U. Wass, *Levels and risk assessment for humans and ecosystems of platinum-group elements in the airborne particles and road dust of some European cities*, Sci. Total Environ., 2002, **299**, 1.
- [36]. M. Moldovan, S. Rauch, M. Gómez, M.A. Palacios y G.M. Morrison, *Bioaccumulation of palladium, platinum and rhodium from urban particulates*

- and sediments by the freshwater isopod Asellus Aquaticus*, Wat. Res., 2001, **35**, 4175.
- [37]. F. Petrucci, B. Bocca, A. Alimonti y S. Caroli, *Determination of Pd, Pt and Rh in airborne particulate and road dust by high-resolution ICP-MS: a preliminary investigation of the emission from automotive catalysts in the urban area of Rome*, J. Anal. At. Spectrom., 2000, **15**, 525
- [38]. K. Ravindra, L. Bencs y R.V. Grieken, *Platinum group elements in the environment and their health risk*, Sci. Total Environ., 2004, **318**, 1.
- [39]. C.L.S. Wiseman y F. Zereini, *Airborne particulate matter, platinum group elements and human health: A review of recent evidence*, Sci. Total Environ., 2009, **407**, 2493.
- [40]. S. Caroli, A. Alimonti, F. Petrucci, B. Bocca, M. Krachler, F. Forastiere, M.T. Sacerdote y S. Mallone, *Assessment of exposure to platinum-group metals in urban children*, Spectrochim. Acta, Part B, 2001, **56**, 1241.
- [41]. R. Merget y G. Rosner, *Evaluation of the health risk of platinum group metals emitted from automotive catalytic converters*, Sci. Total Environ., 2001, **270**, 165.
- [42]. J. Begerow, M. Turfeld y L. Dunemann, *Determination of Physiological Palladium, Platinum, Iridium and Gold Levels in Human Blood Using Double Focusing Magnetic Sector Field Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*, J. Anal. At. Spectrom., 1997, **12**, 1095.
- [43]. L.A. Simpson, M. Thomsen, B.J. Alloway y A. Parker, *A dynamic reaction cell (DRC) solution to oxide-based interferences in inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) analysis of the noble metals*, J. Anal. At. Spectrom., 2001, **16**, 1375.
- [44]. S.F. Kan y P.A. Tanner, *Determination of platinum in roadside dust samples by dynamic reaction cell-inductively coupled plasma-mass spectrometry*, J. Anal. At. Spectrom., 2004, **19**, 639.
- [45]. B. Godlewska-Zykiewicz, *Preconcentration and separation procedures for the spectrochemical determination of platinum and palladium*, Microchim. Acta, 2004, **147**, 189
- [46]. M.B. Gómez, M.M. Gómez y M.A. Palacios, *ICP-MS determination of Pt, Pd and Rh in airborne and road dust after tellurium coprecipitation*, J. Anal. At. Spectrom., 2003, **18**, 80

- [47]. K. Saito, I. Taninaka, Y. Yamamoto, S. Murakami y A. Muromatsu, *Liquid-liquid extraction of platinum(II) with cyclic tetrathioethers*, Talanta, 2000, **51**, 913.
- [48]. B. Godlewska-Zylkiewicz y M. Zaleska, *Preconcentration of palladium in a flow-through electrochemical cell for determination by graphite furnace atomic absorption spectrometry*, Anal. Chim. Acta, 2002, **462**, 305
- [49]. B. Godlewska-Zylkiewicz, *Biosorption of platinum and palladium for their separation and preconcentration prior to graphite furnace atomic absorption spectrometric determination*, Spectrochim. Acta, Part B, 2003, **58**, 1531.
- [50]. R. Juvonen, T. Lakomaa y L. Soikkeli, *Determination of gold and the platinum group elements in geological samples by ICP-MS after nickel sulphide fire assay: difficulties encountered with different types of geological samples*, Talanta, 2002, **58**, 595.
- [51]. C.-H. Gong, *Determination of the trace platinum and palladium in anode neutralization by GFAAS and preconcentration with fire assaying*, Guangpu Shiyanshi, 2006, **23**, 1009.
- [52]. Y. Zhang, Z. Cheng y H. Li, *Detection of ultra-trace gold, silver, platinum and palladium in geological samples by inductively coupled plasma-mass spectroscopy combined with thiourea resin preconcentration*, Fenxi Shiyanshi, 2006, **25**, 105.
- [53]. P. Liu, Q. Pu y Z. Su, *Synthesis of silica gel immobilized thiourea and its application to the on-line preconcentration and separation of silver, gold and palladium*, Analyst, 2000, **125**, 147.
- [54]. F.E. Smith y E.A. Arsenault, *Microwave-assisted sample preparation in analytical chemistry*, Talanta, 1996, **42**, 1207.
- [55]. I.V. Kubrakova, *Effect of microwave radiation on physicochemical processes in solutions and heterogeneous systems: Applications in analytical chemistry*, J. Anal. Chem., 2000, **55**, 1113.
- [56]. K. Benkhedda, B. Dimitrova, H.G. Infante, E. Ivanova y F.C. Adams, *Simultaneous on-line preconcentration and determination of Pt, Rh and Pd in urine, serum and road dust by flow injection combined with inductively coupled plasma time-of-flight mass spectrometry*, J. Anal. At. Spectrom., 2003, **18**, 1019.
- [57]. P. Liu, Z. Su, X. Wu y Q. Pu, *Application of isodiphenylthiourea immobilized silica gel to flow injection on-line microcolumn preconcentration and separation*

- coupled with flame atomic absorption spectrometry for interference free determination of trace silver, gold, palladium and platinum in geological and metallurgical samples*, J. Anal. At. Spectrom., 2002, **17**, 125.
- [58]. A. Limbeck, E. Rudolph, S. Hann, G. Koellensperger, G. Stingeder y J. Rendla, *Flow injection on-line pre-concentration of platinum coupled with electrothermal atomic absorption spectrometry*, J. Anal. At. Spectrom., 2004, **19**, 1474
- [59]. P. Kovacheva y R. Djingova, *Ion-exchange method for separation and concentration of platinum and palladium for analysis of environmental samples by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry*, Anal. Chim. Acta, 2002, **464**, 7
- [60]. R. Djingova, H. Heidenreich, P. Kovacheva y B. Markert, *On the determination of platinum group elements in environmental materials by inductively coupled plasma mass spectrometry and microwave digestion*, Anal. Chim. Acta, 2003, **489**, 245.
- [61]. C.M.P.V. Lopes, A. A. Almeida, M.L.M.F.S. Saraiva y J.L.F.C. Lima, *Determination of Rh, Pd and Pt in urine samples using a pre-concentration sequential injection analysis system coupled to a quadrupole-inductively coupled plasma-mass spectrometer*, Anal. Chim. Acta, 2007, **600**, 226.
- [62]. H. Alsenz, F. Zereini, C.L.S. Wiseman y W. Puettmann, *Analysis of palladium concentrations in airborne particulate matter with reductive co-precipitation, He collision gas, and ID-ICP-Q-MS*, Anal. Bioanal. Chem., 2009, **395**, 1919.

III. CAPÍTULO 2

DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE UN SISTEMA DE INTRODUCCIÓN DE MUESTRAS MÚLTIPLE, PARA LAS TÉCNICAS ANALÍTICAS BASADAS EN PLASMA DE ACOPLAMIENTO INDUCTIVO

III.1. Introducción

La Espectrometría de Emisión Óptica por Plasma de Acoplamiento Inductivo (“Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy”, ICP-OES), la Espectrometría de Emisión Óptica por Plasma Inducido por Microondas (“Microwave Induced Plasma Optical Emission Spectrometry”, MIP-OES) y la espectrometría de Masas por Plasma de Acoplamiento Inductivo (“Inductively Coupled Plasma Mass Spectroscopy”, ICP-MS) son técnicas espectroscópicas que pueden ser utilizadas para comprobar la presencia e identificar elementos específicos, aunque su principal aplicación es la determinación de la concentración de elementos en muestras. En todas ellas los analitos son transformados independientemente de su forma química en la muestra, en átomos y/o iones en fase gaseosa. En la Espectrometría de Absorción Atómica en Llama (“Flame Atomic Absorption Spectrometry”, FAAS), en ICP-OES y en MIP-OES los átomos y/o iones en fase gaseosa absorben o emiten radiación energía de ciertas regiones del espectro electromagnético. En ICP-MS los analitos son transformados en iones en fase gaseosa, y dichos iones son identificados y cuantificados según su relación masa/carga (m/q) [1].

La instrumentación utilizada en espectrometría atómica analítica ha sufrido en los últimos años un gran avance gracias a los desarrollos en los componentes ópticos y electrónicos. La instrumentación de ICP-OES, además de reducir su coste, se ha convertido en una técnica mucho más potente con la introducción de monocromadores y policromadores de alta resolución, detectores en serie multicanales que permiten obtener el espectro de emisión completo en una sola lectura, entre otros [2-4]. Recientemente, la casa comercial Agilent Technologies ha presentado un espectrómetro MIP-OES que puede ser utilizado de forma autónoma, sin la necesidad de suministro externo de gases ya que posee un generador de nitrógeno propio. La técnica ICP-MS también ha evolucionado hacia su simplificación con el fin de obtener instrumentos cada vez más pequeños, automatizados y fáciles de manejar, junto con una reducción en los costes de mantenimiento. Aunque el avance más significativo de esta técnica analítica se ha producido en la identificación y corrección de interferencias fundamentalmente espectrales, mediante programas avanzados o dispositivos instrumentales (e.g., ecuaciones matemáticas, tecnología de celda de colisión, celda de reacción dinámica, interfase colisión-reacción) [3,5,6].

A pesar de todas estas mejoras, el sistema de introducción de muestras líquidas ha sido el componente que ha experimentado un menor avance. No obstante, en los últimos años se ha realizando un gran esfuerzo en el desarrollo de nuevos y más eficientes sistemas de introducción de muestras asimismo en la mejora de los ya existentes [7]. Sin embargo, todavía hoy se puede afirmar que el sistema de introducción de muestras líquidas es “el talón de Aquiles de la Espectrometría Atómica” [8], y se considera uno de los factores que limitan la capacidad de análisis de estas técnicas.

III.1.1. Espectrometría de emisión óptica por plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES)

El objetivo básico de la espectrometría atómica analítica es identificar elementos y determinar sus concentraciones en diferentes medios. La espectrometría de emisión óptica (OES) es una de las ramas de la espectrometría analítica con la que se obtiene información analítica a partir de un espectro atómico en la región del espectro electromagnético ultravioleta (UV), visible (VIS) e infrarrojo cercano (NIR).

Los componentes de un instrumento de ICP-OES típico se muestran en la Figura III.1 ([9]).

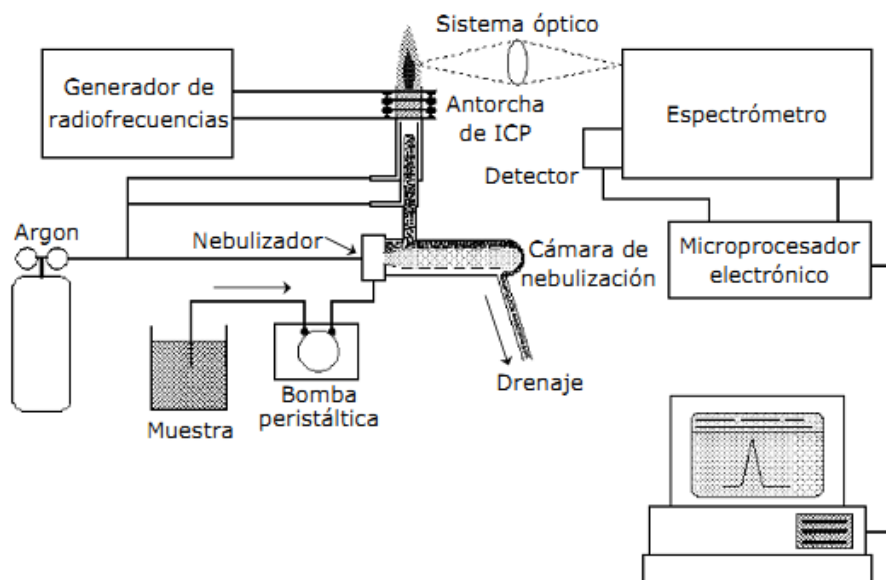


Figura III.1: Componentes principales de un ICP-OES típico y su disposición [9].

Si la muestra es líquida, normalmente la misma es introducida en el plasma a través de un sistema de introducción de muestras líquidas adecuado el cual está construido constituido por un nebulizador, el cual genera el aerosol primario, una cámara de nebulización, a la salida de la cual se obtiene el aerosol terciario y, por último, un sistema inyector del aerosol en el plasma. Las características analíticas de un instrumento de ICP-OES (i.e., sensibilidad, precisión, intervalo lineal y límites de detección, entre otras) están directamente relacionadas con la eficiencia del sistema de introducción de muestras que, en el caso de muestras líquidas a su vez depende de una forma importante de las características del aerosol generado por el nebulizador. La robustez de la técnica permite el análisis de muestras con diferentes tipos de matrices, desde disoluciones de alto contenido salino hasta ácidos diluidos. Las muestras líquidas y gaseosas se introducen directamente en el instrumento mientras que las muestras sólidas requieren normalmente de una etapa previa de extracción o digestión ácida, o bien ablación por laser.

La fuente de generación del plasma más utilizada es un potente campo de radiofrecuencias que acoplado con un gas (normalmente argón) genera el plasma por acoplamiento inductivo (ICP), el cual es una fuente de atomización/ionización excelente. El ICP se mantiene sobre una antorcha formada por tres tubos concéntricos a través de los cuales fluyen corrientes de argón con un caudal total comprendido entre 11-17 L min⁻¹. Rodeando la parte superior de este tubo se encuentra una bobina de inducción refrigerada por agua o aire, y alimentada por un generador de radiofrecuencias (Figura III.2, [10,11]) [9,12].

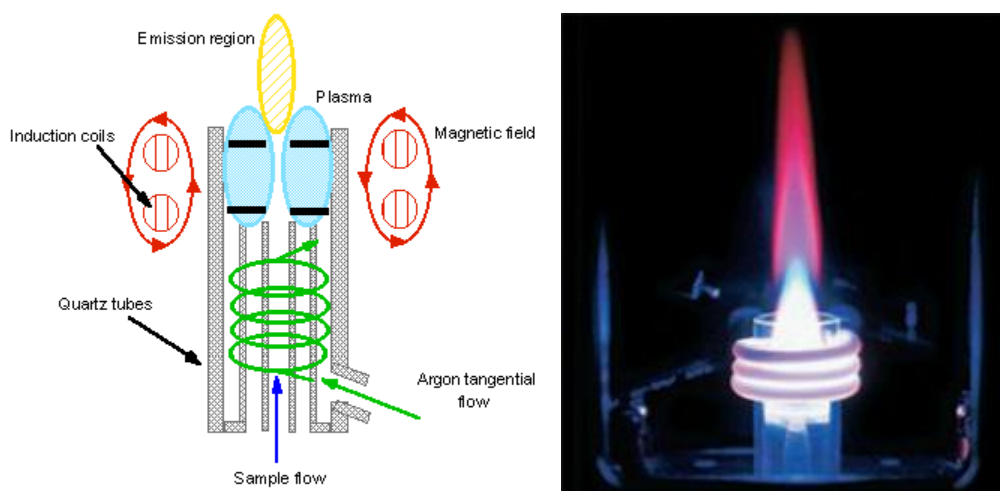


Figura III.2: Esquema y fotografía de una antorcha de plasma de acoplamiento inductivo [10,11].

Cuando la muestra es introducida en forma de un aerosol, los procesos generales que ocurren en el plasma son: (i) desolvatación, vaporización, atomización y/o ionización de la muestra (disociación en átomos y/o iones libres); (ii) excitación de los átomos o iones libres de los elementos a determinar (analitos) y; (iii) emisión de fotones cuando los átomos o iones vuelven a su estado fundamental. Para que se produzcan estos procesos se debe utilizar una fuente que suministre suficiente energía. Una fuente de emisión atómica ideal debe presentar las siguientes características [13]:

- Una extracción completa del analito desde su matriz original con el fin de minimizar las interferencias;
- Una atomización completa, pero una ionización mínima, de todos los elementos cuando se analizan sus líneas atómicas;
- Que genere una energía suficiente para producir la excitación de todos los elementos;
- Un medio químicamente inerte que impida la formación de especies moleculares como óxidos y carburos, entre otras, ya que pueden afectar a la sensibilidad y a la precisión;
- Que no emita radiación de fondo (emisión atómica o molecular) que puede interferir en la señal analítica;
- Que pueda ajustarse para manipular diferentes tipos de disolventes (orgánicos y/o inorgánicos);
- Que se pueda ajustar para manipular sólidos, suspensiones, líquidos o gases;
- Que tenga bajo coste de adquisición y mantenimiento;
- Que sea fácil de manejar.

En ICP-OES la detección y cuantificación de los analitos se realiza en base a la emisión espontánea de radiación (fotones) de átomos y/o iones excitados cuando vuelven a su estado fundamental. La característica fundamental de este proceso es que cada elemento emite fotones a longitudes de onda específicas, es decir, tiene un espectro de emisión característico. La disolución de la muestra transformada por el sistema de introducción en un aerosol se introduce directamente en el canal central del plasma. La elevada temperatura del interior del plasma, aproximadamente 10000 K,

proporciona energía suficiente para que la muestra sea desolvatada, vaporizada y atomizada en sus correspondientes componentes obteniéndose átomos libres en estado gaseoso. Normalmente se dispone de suficiente energía para que se produzca la ionización total o parcial de los átomos generándose iones libres en estado gaseoso y, en ocasiones, también se producirán procesos de recombinación con otras especies presentes. ICP-OES es una técnica analítica relativa, por lo tanto, para obtener información cuantitativa la respuesta del instrumento debe compararse frente a patrones que contengan concentraciones conocidas de los analitos [12].

El sistema óptico que recoge y dirige los fotones emitidos puede observar el plasma de dos maneras diferentes, axial o radial (Figura III.3, [14]).

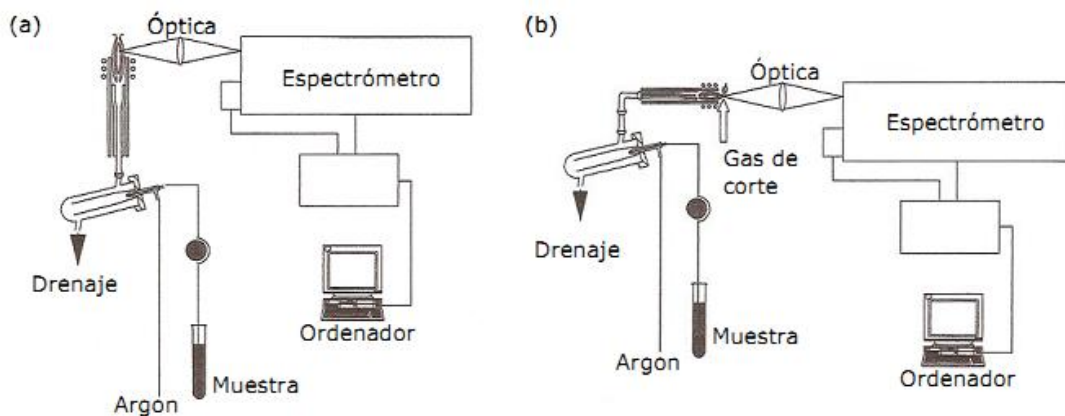


Figura III.3: Configuraciones de observación del plasma. a) radial; b) axial [14].

El haz de fotones procedente del plasma se dirige hacia el espectrómetro el cual está formado por la combinación de un sistema óptico de enfoque, un monocromador o policromador y un detector. Su función es transformar el haz de fotones procedentes del plasma en un haz de luz bien definido, dispersarlo de acuerdo a sus longitudes de onda y focalizar dichas longitudes de onda dispersadas en el detector, el cual mide la intensidad de emisión a las longitudes de onda seleccionadas. La señal que sale del detector es amplificada, transformada en una señal digital mediante un convertidor analógico-digital e introducida en un microordenador. Con un programa informático adecuado se puede realizar el tratamiento, cálculo y estudio de los resultados y, finalmente, imprimir un informe.

La técnica ICP-OES puede utilizarse para determinar la concentración de más de 70 elementos desde niveles de $\mu\text{g L}^{-1}$ (partes por billón, ppb) hasta mg L^{-1} (partes por millón, ppm) en un único análisis, necesitando menos de 2 minutos después de la calibración para realizar el análisis. Algunos campos de aplicación de la técnica son: medio ambiente, aguas, agricultura, alimentos, geología, biología y análisis clínicos, nuevos materiales, entre otros [9].

III.1.2. Sistemas de introducción de muestras líquidas en ICP-OES/MS

Generalmente las muestras que se introducen en un instrumento de ICP se encuentran en estado líquido debido fundamentalmente a que se trata de muestras en las que el analito se encuentra distribuido homogéneamente en el medio, son fáciles de manipular, se pueden preparar patrones de calibración y la mayoría de las especies metálicas pueden ponerse en disolución. A partir de esta masa líquida se genera un aerosol de la muestra mediante un nebulizador, el cual es transportado a través de una cámara de nebulización llegando finalmente a la célula de atomización/ionización (i.e., plasma). En ocasiones la muestra puede necesitar más tratamientos previos o presentarse en otros estados físicos. Dichos tratamientos deben asegurar que, después de su aplicación, la misma presentará las características adecuadas para aplicar la técnica de análisis deseada. También pueden analizarse directamente sólidos sin necesidad de descomposición mediante ablación con láser. El camino que recorre la muestra en un sistema de introducción de muestras líquidas convencional para ICP se puede resumir brevemente de la siguiente manera (Figura III.4.)

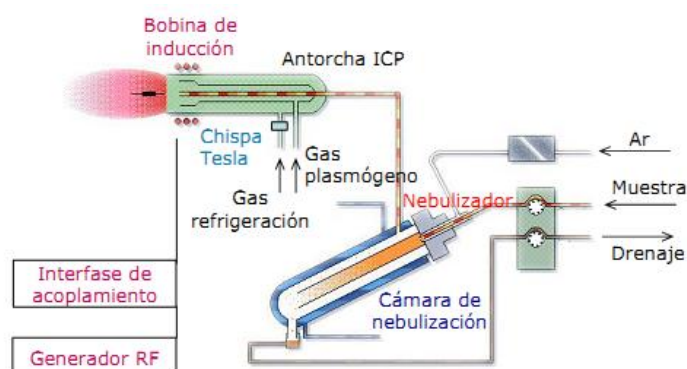


Figura III.4: Esquema general de un sistema de introducción de muestras líquidas para técnicas analíticas basadas en ICP.

La muestra, en este caso en estado líquido, se bombea a un determinado caudal líquido (Q_1) normalmente con una bomba peristáltica hacia un nebulizador, el cual la transformará en un aerosol fino con ayuda de una corriente de argón a elevada velocidad. Las gotitas finas del aerosol se separan de las gotas grandes al pasar a través de una cámara de nebulización. Las gotas de mayor tamaño son eliminadas mediante un sistema de drenaje normalmente controlado por la misma bomba peristáltica utilizada para introducir la muestra. El aerosol formado por las gotas más finas sale de la cámara de nebulización y se transporta hasta la base del plasma a través de un tubo inyector. Las dimensiones del tubo inyector (longitud y diámetro) dependerán del tipo de matriz de la muestra a analizar (orgánica, acuosa o salina). En el breve intervalo de tiempo que las gotas del aerosol se encuentran en el plasma experimentan los procesos de desolvatación, vaporización, atomización, ionización y excitación. Si se trabaja en la modalidad de emisión se mide la cantidad de fotones emitidos a una determinada longitud de onda, y si se hace en la modalidad de masas se mide el número de iones que alcanzan el detector para una determinada relación masa/carga (m/q).

De forma general, los requisitos que debe cumplir un sistema de introducción de muestras ideal son los siguientes:

- Transportar la muestra hasta el plasma de forma eficiente;
- Ser eficiente con todo tipo y cantidad de muestra;
- Presentar una buena reproducibilidad a corto y largo plazo;
- Presentar bajos efectos de memoria;
- Ser adecuado para las diferentes técnicas que se engloban en el término

Espectrometría Atómica Analítica.

Actualmente no existe un sistema de introducción de muestras ideal que cumpla todos estos requisitos de forma simultánea. Esto obliga en la práctica a la búsqueda de una solución de compromiso que tenga en cuenta las características concretas del problema analítico planteado. Las consideraciones a tener en cuenta para una correcta elección del sistema de introducción de muestras son, entre otras: (i) naturaleza de la muestra, (ii) cantidad de muestra disponible, (iii) niveles de concentración del analito a determinar, (iv) técnica analítica a utilizar y, (v) precisión y exactitud requeridas.

III.1.3. Nebulizadores

La forma más común de transportar las muestras líquidas hasta el plasma es en forma de un aerosol el cual es generado con un nebulizador. Una de las características más importantes de los aerosoles es su elevada relación superficie-volumen. La importancia de esta propiedad radica en que cuanto mayor sea este cociente más eficiente será el transporte de analito en el plasma, así como la evaporación del disolvente, facilitando la vaporización de la muestra.

El comportamiento de las técnicas espectroscópicas basadas en ICP está muy condicionado por la calidad del aerosol generado. La eliminación de las gotas grandes de la corriente gaseosa mejorará el comportamiento del aerosol. Con este fin, después del nebulizador se coloca una cámara de nebulización, cuya función es la de separar y desechar las gotas grandes de disolución que se han formado, y, en algunos casos, un sistema de desolvatación, con lo que se disminuye el tamaño de las gotas y la carga de disolvente en el plasma. Las funciones de un aerosol en Espectrometría Atómica Analítica se pueden resumir en los siguientes puntos:

- Transformar la muestra líquida en un estado en el que ésta pueda ser eficazmente transportada e introducida en la célula de atomización (llama o plasma);
 - Permitir la rápida evaporación del disolvente en la célula de atomización, lo que se favorece con un aerosol fino y monodisperso;
 - Asegurar que el analito, una vez evaporado el disolvente, se encuentre en forma de partículas lo suficientemente pequeñas como para que experimente su total vaporización, atomización, ionización y/o excitación durante el breve período de tiempo que transcurre mientras atraviesa el plasma (i.e., tiempo de residencia del analito en el plasma).

Por lo tanto, se puede concluir que un aerosol ideal en Espectrometría Atómica es aquel que: (i) no produce cambios significativos en las propiedades fundamentales térmicas del plasma (i.e., temperatura del plasma y densidad electrónica), (ii) no afecta a la zona de muestreo óptima en el análisis de diferentes muestras, (iii) consiste en gotas finas y monodispersas con una velocidad uniforme y, (iv) no contribuye de forma importante a la carga de disolvente en el plasma [15].

Básicamente el proceso de nebulización consiste en la transformación de un volumen de líquido en un conjunto de gotas suspendidas en un gas. La práctica totalidad de los mecanismos de nebulización se basan en la generación de una inestabilidad sobre la superficie del líquido. Para ello, se aporta una cierta cantidad de energía a la masa líquida la cual es utilizada para vencer las fuerzas de cohesión del líquido (i.e., tensión superficial, viscosidad, entre otras). Dependiendo de la naturaleza y tipo de energía que se utiliza para generar la inestabilidad hay diferentes mecanismos de nebulización y, por tanto, diferentes tipos de nebulizadores (Tabla III.1).

Tabla III.1: Tipos de nebulizadores utilizados en espectrometría atómica [16,17].

Tipo de nebulizador	Energía	Procedencia de la energía
Neumático	Cinética	Energía cinética procedente de una corriente gaseosa (aire y argón, entre otros) a elevada velocidad.
Térmico	Calor	Energía cinética procedente del vapor del disolvente de la disolución a nebulizar (calentamiento térmico de una corriente líquida seguido de la expansión adiabática del vapor generado).
Hidráulico	Hidráulica	Energía cinética de la vena líquida la cual es obligada a pasar por un orificio estrecho.
Ultrasónico	Ultrasonidos	Energía ultrasónica de un transductor piezoeléctrico que vibra a frecuencias en la región de los ultrasonidos.
Electrostático	Eléctrica	Diferencia de potencial aplicada entre un capilar metálico a través del cual se bombea la muestra líquida y un electrodo.
Rotatorio	Centrífuga	Superficie horizontal o cóncava capaz de girar a frecuencias elevadas.

Los nebulizadores más utilizados para la introducción de muestras líquidas en las técnicas basadas en ICP son los nebulizadores neumáticos debido, fundamentalmente, a su fácil manejo, robustez y bajo coste. Otro dispositivo también utilizado es el nebulizador ultrasónico. El resto de nebulizadores se han utilizado en menor grado y en aplicaciones muy concretas.

En los nebulizadores neumáticos el aerosol se genera como consecuencia de la interacción entre una corriente líquida y otra gaseosa a alta velocidad. La corriente gaseosa transfiere a la líquida parte de su energía cinética utilizándose ésta en la generación de superficie (aerosol primario).

Los procesos que ocurren cuando una corriente gaseosa a alta velocidad interactúa con una corriente líquida son básicamente dos: (i) alteración de la superficie líquida por parte de la corriente gaseosa para formar ondas superficiales y, (ii) posterior crecimiento

y ruptura de las ondas creadas para formar las gotas [17]. Una breve descripción de estas etapas sería:

- *Alteración de la superficie líquida:* Suponiendo que la superficie líquida es plana inicialmente, la corriente gaseosa solo ejerce fuerzas tangenciales sobre la misma, lo cual implica que la velocidad de transferencia de energía entre ambas corrientes es pequeña. No obstante, debido a la interacción entre ambas corrientes, la superficie de la vena líquida sufre aceleración y aparecen perturbaciones superficiales en forma de ondas. A pesar de la existencia de fuerzas que tienden a oponerse a la deformación de la superficie líquida debido a la acción de la corriente gaseosa (i.e., la fuerza gravitatoria se opone a la elevación de la superficie, mientras que la curvatura de la superficie resultante produce un exceso de presión debido a la tensión superficial la cual es inversamente proporcional al radio de la curvatura), la energía que posee la corriente gaseosa es suficiente para que se generen ondas de diferente longitud de onda sobre la superficie del líquido.

- *Crecimiento y ruptura de las ondas:* Cuando se han creado estas perturbaciones sobre la superficie líquida, la interacción gas-líquido ya no es únicamente de tipo tangencial, sino que la corriente gaseosa incide también perpendicularmente sobre las ondas. Este hecho favorece enormemente la transferencia de energía desde la corriente gaseosa a la líquida lo que aumenta su inestabilidad superficial, produciéndose la ruptura de este en gotas individuales cuando se vencen sus fuerzas internas (viscosidad y tensión superficial, entre otras).

Según la geometría relativa de las corrientes líquida y gaseosa existen varios tipos de nebulizadores neumáticos siendo los más populares los siguientes: nebulizadores concéntricos, nebulizador de alta presión [18], nebulizadores de flujo cruzado [19,20], nebulizador neumático anti-bloqueo (Babington) [21], nebulizador neumático de surco en V (V-groove) [22,23], nebulizador neumático cónico (Conespray) [24], nebulizador neumático de vidrio fritado [25], nebulizador neumático de rejilla [26] y nebulizador neumático de flujo paralelo [27], entre otros.

III.1.3.1. Micronebulizadores

En muchas ocasiones la cantidad, o el flujo, de muestra disponible constituyen un factor limitante. Por ello, en los últimos años, los trabajos de investigación sobre sistemas de introducción de muestras líquidas en Espectrometría Atómica Analítica de plasma, ICP-OES e ICP-MS, se han dirigido hacia la reducción de los flujos de muestra, es decir, hacia el análisis de micro- y nanomuestras. Algunos de los motivos que explican este hecho son: (i) en algunas aplicaciones (e.g., biológicas, forenses y análisis clínicos, entre otras) el volumen de muestra disponible es limitado, pudiendo ser menor de 1 mL; (ii) los sistemas de bajo consumo de muestra proporcionan eficiencias de transporte de analito superiores que los sistemas convencionales; (iii) la utilización de sistemas combinados de separación-detección, y fundamentalmente en sus modalidades miniaturizadas, ha obligado al desarrollo de interfases de bajo consumo de muestra; (iv) diferentes interferencias causadas por el disolvente (e.g., concentración de ácidos inorgánicos en el plasma, interferencias poliatómicas en ICP-MS) pueden ser reducidas trabajando con bajos caudales de muestra y; (v) los residuos tóxicos y radioactivos deben ser minimizados [28].

Normalmente, cuando se analizan muestras líquidas mediante ICP-OES o ICP-MS el nebulizador, acoplado a una cámara de nebulización, trabaja con un caudal de muestra comprendido entre 0.5 y 2 mL min⁻¹. Teniendo en cuenta el tiempo requerido para realizar una lectura de la señal completa (entre 1 y 5 minutos dependiendo del sistema de detección y del número de elementos a determinar) el volumen de muestra requerido varía entre 1 y 10 mL. Además, la eficiencia de transporte de los nebulizadores neumáticos convencionales varía entre un 1 y un 5%. En el caso del nebulizador ultrasónico la eficiencia de transporte es aproximadamente de un 20%, pero este nebulizador requiere el uso de un sistema de desolvatación lo que puede originar interferencias para ciertas muestras y el caudal líquido requerido normalmente es de 2-2.5 mL min⁻¹. Por tanto, el análisis de pequeños volúmenes de muestra con estos nebulizadores está muy limitado [29,30].

Uno de los principales frutos de esta actividad investigadora con nebulizadores convencionales ha sido el desarrollo de los denominados micronebulizadores [31]. Estos nebulizadores son capaces de trabajar con un caudal líquido de unos pocos microlitros por minuto. En comparación con los nebulizadores convencionales, cuyos caudales líquidos son del orden de un mililitro por minuto, el diseño de los micronebulizadores

ha sido modificado con el fin de que permitan trabajar con caudales bajos ($< 100\text{-}200 \mu\text{L min}^{-1}$).

III.1.3.2. Nebulizador neumático concéntrico

La Figura III.5 ([32]) muestra el esquema de un nebulizador neumático concéntrico convencional, pudiéndose observar sus diferentes partes:

- El conducto por el que se introduce la muestra (entrada de líquido) el cual se acopla a una bomba peristáltica a través de un capilar de diámetro conocido;
- El conducto por el que se introduce el gas, normalmente argón.
- El cuerpo del nebulizador;
- El capilar concéntrico, dentro del cuerpo, a través del cual se transporta la muestra líquida (capilar de muestra);
- La punta del nebulizador, donde se genera el aerosol.

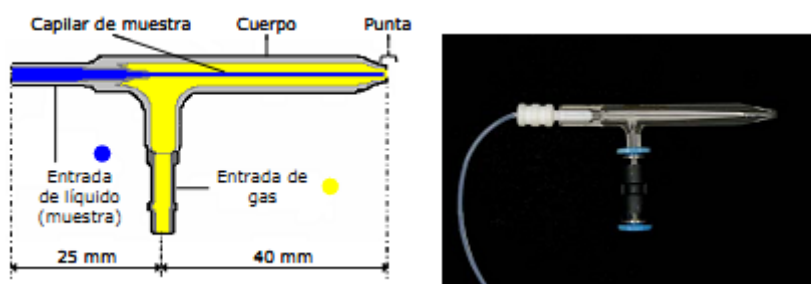


Figura III.5: Esquema general y fotografía de un nebulizador neumático concéntrico convencional [32].

En los nebulizadores neumáticos concéntricos el conducto de la muestra es concéntrica al de la corriente gaseosa, siendo la interacción entre ambas corrientes de forma tangencial. La geometría de dicha interacción es anular (Figura III.6, [32]).

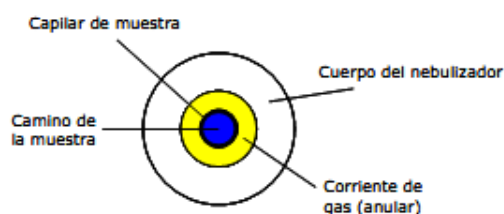


Figura III.6: Vista frontal de la punta de un nebulizador neumático concéntrico [32].

Los nebulizadores neumáticos concéntricos son los más utilizados en Espectrometría Atómica debido a que son fáciles de manejar, relativamente baratos y presentan una adecuada robustez. Por su propio principio de funcionamiento (efecto Venturi) la muestra puede ser introducida sin necesidad de bombeo exterior (aspiración libre) [17,33].

Actualmente en el mercado existe una gran variedad de nebulizadores de este tipo, tanto convencionales, como micronebulizadores o nebulizadores de inyección directa. Las principales casas comerciales que producen estos dispositivos son Glass Expansion [34], Meinhard [35], CETAC [36], Precision Glassblowing [20], entre otros. En la Figura III.7 ([34]) se muestran las diferentes opciones de elección de nebulizador, ofrecidas actualmente por la casa comercial Glass Expansion, según el tipo de aplicación.

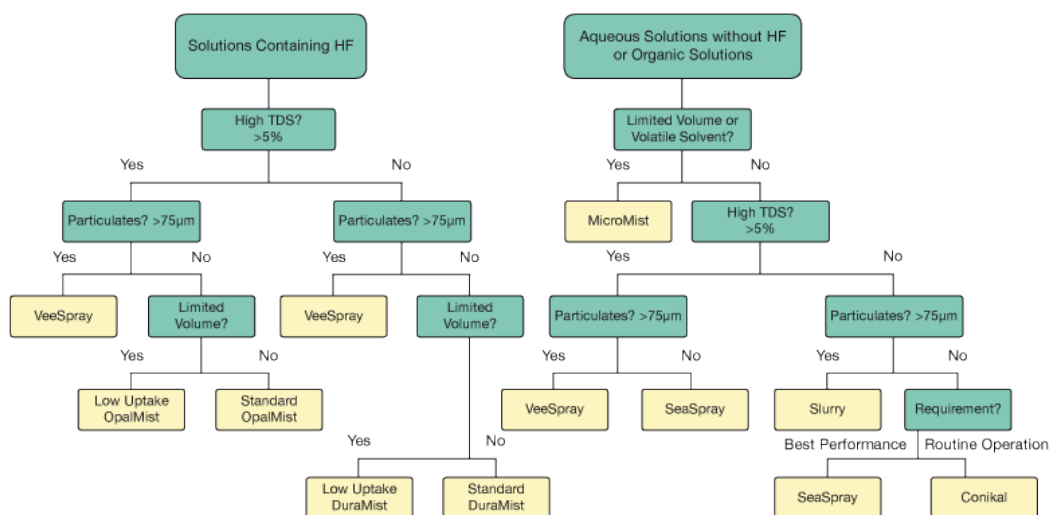


Figura III.7: Guía de selección de nebulizador según la aplicación, de la casa comercial Glass Expansion [34].

III.1.3.3. Tecnologías de nebulización “Flow Focusing”[®] y “Flow Blurring”[®]

La mayoría de los nebulizadores utilizados en Espectrometría Atómica Analítica provienen de diseños ya empleados en aplicaciones ingenieriles, los llamados atomizadores [16]. Para su adaptación a las técnicas atómicas han sido necesarias unas

modificaciones en su diseño con el fin de cumplir los requisitos impuestos por la técnica analítica concreta (e.g., caudales líquidos y gaseosos para técnicas de ICP).

Los diferentes tipos de nebulizadores han sido surgiendo como resultado de la búsqueda de un nebulizador único y universal, el cual fuera capaz de trabajar eficazmente con cualquier tipo de muestra y en diferentes condiciones de trabajo proporcionando un alto rendimiento analítico. Sin embargo, cada una de las técnicas de nebulización presenta ciertas limitaciones.

En el presente apartado se introducen dos nuevas tecnologías de nebulización que, al igual que los casos anteriores, fueron desarrolladas inicialmente para aplicaciones ingenieriles. En base a sus exclusivas propiedades y a las buenas características de los aerosoles que generan, estas tecnologías han despertado el interés en técnicas de plasma, donde el rendimiento de los instrumentos depende de manera crítica de las características de los aerosoles generados.

III.1.3.3.1. Tecnología “Flow Focusing”[®]

La tecnología “Flow Focusing”[®] (FF) se basa en el fenómeno de microenfocamiento capilar descubierto en 1994 por el Dr. Alfonso M. Gañán-Calvo (Universidad de Sevilla) y patentado en 2000 [37]. Los dispositivos “Flow Focusing”[®] se basan en la formación de una microvena estacionaria de un fluido “enfocado” en el núcleo de una corriente laminar de otro fluido “enfocante” altamente acelerado. La configuración básica de estos dispositivos consiste en un capilar fino perfectamente alineado con un orificio realizado en una lámina delgada. Cuando el fluido sale del capilar es enfocado por otro fluido circundante formando una microvena que atraviesa el orificio sin tocarlo. Bajo ciertas condiciones se consigue una vena fina, estable, reproducible y controlable que, finalmente, se rompe produciendo un aerosol con un alto grado de monodispersión en el tamaño de las gotas.

Dependiendo de la naturaleza de ambos fluidos se pueden considerar las siguientes configuraciones “Flow Focusing”[®] [38]:

- Gas-Líquido. El fluido enfocado es una corriente líquida y el fluido enfocante es una corriente gaseosa, obteniéndose como resultado la generación de un aerosol (i.e., conjunto de gotas líquidas suspendidas en una corriente gaseosa);

- Líquido-Gas. El fluido enfocado es una corriente gaseosa y el fluido enfocante es una corriente líquida. Como resultado se obtiene la generación de burbujas (i.e., una capa de líquido que rodea a un núcleo esférico de gas);
- Líquido-Líquido. El fluido enfocado es un líquido inmiscible con el líquido enfocante. Con esta configuración se obtienen partículas esféricas donde una capa de líquido rodea a núcleos formados por otro líquido inmiscible con el anterior;
- Compuesta. En esta configuración se tienen dos corrientes de líquidos inmiscibles entre si que salen en disposición concéntrica y que son a su vez enfocados por una corriente de gas a presión. De esta forma se generan microcápsulas con paredes de espesor controlable mediante una adecuada selección de la relación de caudales de todas las corrientes.

En la espectrometría atómica analítica la muestra normalmente se encuentra en estado líquido y se transporta hasta la fuente de atomización en forma de un aerosol. Por ello, en el desarrollo de los nebulizadores analíticos “Flow Focusing”[®] para su aplicación en técnicas basadas en ICP se utilizó inicialmente la configuración “Flow Focusing”[®] gas-líquido (la muestra líquida se introduce mediante bombeo y cuando sale del capilar es enfocada hacia el orificio de la lámina mediante una corriente gaseosa).

Mecanismo de nebulización “Flow Focusing”[®]

La Figura III.8 ([32]) muestra un esquema del diseño de la punta de un nebulizador basado en la tecnología “Flow Focusing”[®] con configuración gas-líquido. Los parámetros indicados se definen como: R_0 , radio del capilar de suministro de la muestra líquida; H , distancia entre la punta del capilar de la muestra y la lámina donde se encuentra el orificio de salida de la vena líquida (aerosol); L , espesor de la lámina y; D , diámetro del orificio de salida de la vena líquida (aerosol). El capilar de la muestra está perfectamente alineado con el orificio de la lámina siendo las dimensiones de estos parámetros del orden de cientos de micras.

La muestra líquida es introducida mediante bombeo y cuando ésta alcanza la punta del capilar es alargada hacia el orificio de la lámina a través del cual fluye una corriente gaseosa. El líquido a la salida de su capilar interacciona con el gas que lo rodea formándose así una cúspide estable en la interfase entre los dos fluidos desarrolla una a una distancia crítica del orificio cuando la presión del gas aplicada a través del orificio

supera suficientemente la fuerza de tensión superficial. Bajo estas condiciones, si se suministra un caudal líquido constante y estable, se alcanza un estado estacionario que promueve la formación de una microvena líquida estacionaria de diámetro d_j . Dicha microvena será estable a lo largo de una distancia más allá del orificio cuya longitud varía entre varias decenas de micrómetros a unos pocos milímetros, dependiendo del caudal líquido, de d_j y de los números de Reynolds y de Weber de la corriente gaseosa. Finalmente, la vena líquida se rompe por inestabilidad capilar generando el aerosol [39].

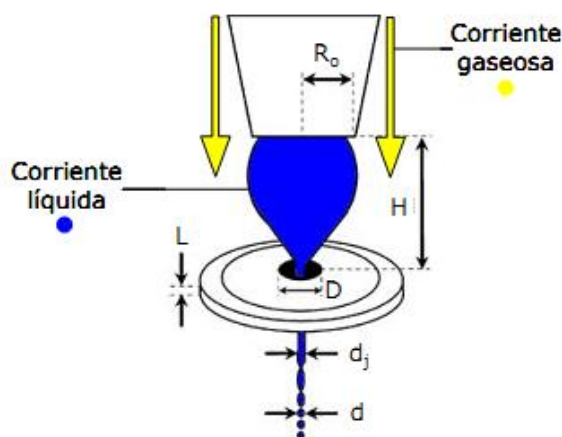


Figura III.8: Esquema de la punta de un nebulizador basado en la tecnología “Flow Focusing”[®] con configuración gas-líquido [32].

El mecanismo de nebulización “Flow Focusing”[®] presenta la ventaja de poder controlar las características (i.e., tamaño de las gotas y dispersión del mismo) del aerosol generado. Esta propiedad se debe al control que se tiene del diámetro de la microvena líquida generada y su modo de rotura en base a una serie de variables externas fácilmente controlables, como son los parámetros geométricos D y H , y los parámetros físicos Q_l y Q_g (ΔP_g) [39,40].

La tecnología “Flow Focusing”[®] se considera un tipo de nebulización neumática ya que el aerosol se genera por la interacción entre una corriente líquida y otra gaseosa a alta presión. No obstante, el mecanismo a través del cual se genera el aerosol difiere sustancialmente del mecanismo neumático que utilizan los nebulizadores descritos en apartados anteriores. Las propiedades de la tecnología “Flow Focusing”[®] indican que la fabricación de nebulizadores neumáticos basados en ésta puede significar una mejora importante en el rendimiento analítico de las técnicas espectroscópicas atómicas basadas en ICP. De entre estas propiedades cabe destacar las siguientes:

- El aerosol generado está formado por gotas muy finas y presenta un elevado grado de monodispersión en el tamaño de las gotas. Ambas propiedades proporcionan unas elevadas eficiencias de transporte del aerosol (analito) al plasma;
- El tamaño de medio gota y el grado de dispersión del aerosol pueden controlarse utilizando ecuaciones sencillas que fijarán los parámetros geométricos y físicos, por lo que se obtiene un aerosol primario controlable y reproducible;
- Un nebulizador basado en la tecnología “Flow Focusing”[®] puede trabajar en un amplio intervalo de caudales líquidos y gaseosos sin riesgo al deterioro o rotura del mismo, y manteniendo la calidad del aerosol generado. Además, cualquier líquido puede ser nebulizado debido a la universalidad del principio de microenfocamiento capilar [39]. El tipo de muestra compatible solo está limitado por la resistencia química del material utilizado en la fabricación del nebulizador;
- El mecanismo de nebulización “Flow Focusing”[®] se basa en el enfocamiento de una microvena líquida que pasa a través de un orificio de tamaño reducido sin tocar las paredes. Este hecho reduce la posibilidad de que se depositen partículas en la punta del nebulizador, lo que también reduce el riesgo de bloqueo del mismo cuando se trabaja con disoluciones muy viscosas, de elevado contenido salino o suspensiones. Además, como no existe contacto físico entre el líquido y el orificio de la placa, las fuerzas de cizalla ejercidas sobre la muestra son mínimas, de manera que un dispositivo “Flow Focusing”[®], puede utilizarse con muestras que contengan partículas o moléculas frágiles (aplicaciones médicas y biológicas) [40,41];
- La tecnología “Flow Focusing”[®] en sus múltiples configuraciones, presenta un gran número de aplicaciones y variadas, como por ejemplo combustión, inhaladores de medicamentos, producción de polvos para sinterización, refrigeración evaporativa (humidificadores) [41], entre otras;
- La tecnología “Flow Focusing”[®] puede acoplarse con la técnica de “Electrospray” combinando las ventajas de ambas. El resultado es un procedimiento de nebulización que genera aerosoles ultrafinos [42];

Aplicación de la tecnología “Flow Focusing”[®] en sistemas de introducción de muestras líquidas en espectroscopia atómica

La tecnología “Flow Focusing”[®] ha sido utilizada en la construcción de varios micronebulizadores neumáticos con fines analíticos [43]. Estos nebulizadores han mostrado un comportamiento excelente en ICP-OES y MIP-OES, superior a otros nebulizadores comerciales, tanto para muestras acuosas [44,45] como con muestras con un alto contenido en sales disueltas [46].

III.1.3.3.2. Tecnología “Flow Blurring”[®]

La Figura III.9 ([32]) muestra un esquema de la geometría de la punta de un nebulizador basado en la tecnología “Flow Blurring”[®]. Los parámetros D y H son los mismos que en la tecnología “Flow Focusing”[®] (i.e., D es el diámetro del orificio de salida del aerosol y H la distancia entre el capilar de suministro de la muestra y la placa donde se sitúa el orificio de salida del aerosol). La configuración “Flow Blurring”[®] se caracteriza por un capilar de líquido cuyo diámetro interno ($2R_0$) es igual al diámetro del orificio de salida (i.e., $2R_0 = D$). Además, ambas secciones están perfectamente alineadas y separadas por una distancia H . La relación entre H y D define la relación geométrica Ψ ($\Psi = H/D$). El extremo del capilar del líquido tiene forma aguda de manera que el espacio entre dicho extremo y el orificio de salida definen un pasillo cilíndrico lateral (“lateral cylindrical passageway”, LCP). La superficie del LCP iguala el área del orificio de salida cuando $\Psi = H/D = 0.25$ [47].

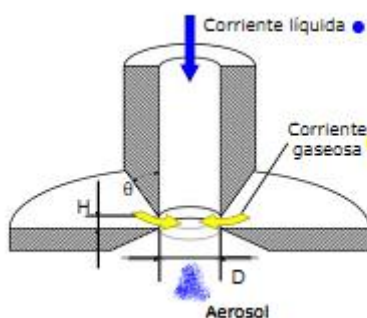


Figura III.9: Esquema de la geometría de la punta de un dispositivo de nebulización basado en la tecnología “Flow Blurring”[®] [32].

El extremo del capilar de líquido se corta de forma afilada, como se muestra en la Figura III.9, para minimizar las fuerzas de fricción del gas entre las paredes del capilar y

las paredes del orificio de salida cuando Ψ es pequeño. La Figura III.10 ([47]) muestra los modelos de interacción entre las corrientes líquida y gaseosa para la configuración “Flow Focusing”[®] (Figura III.10(a)) y la configuración “Flow Blurring”[®] (Figura III.10(b)). Las flechas negras indican las líneas de flujo de la corriente gaseosa y las flechas grises las líneas de flujo de la corriente líquida.

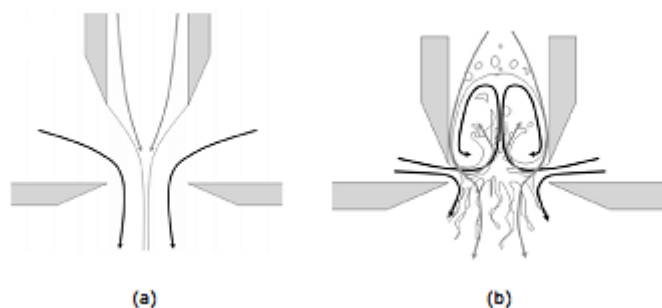


Figura III.10: (a) Configuración “Flow Focusing”[®], ($\Psi = 1$); (b) configuración “Flow Blurring”[®] ($\Psi = 0.2$) [47].

Aplicación de la tecnología “Flow Blurring”[®] en sistemas de introducción de muestras líquidas en espectroscopia atómica

El mecanismo de nebulización “Flow Blurring”[®] ha servido como base para el desarrollo del nebulizador OneNeb[®] [48] (Figura III.11). El OneNeb[®] ha sido desarrollado como fruto de la cooperación entre las Universidades de Alicante y de Sevilla. Dicho nebulizador genera aerosoles de unas características excelentes para una gran variedad de condiciones de nebulización y de tipos de muestras. Su intervalo de caudales líquidos de muestra es desde $0.005 \text{ mL min}^{-1}$ hasta más que 2.5 mL min^{-1} . Además, está construido con materiales de gran resistencia física y química, lo que le proporciona una gran resistencia a muestras corrosivas (incluso con altos contenidos de ácido fluorhídrico).



Figura III.11: Fotografía del nebulizador OneNeb[®].

Esto hace que el nebulizador OneNeb[®] sea un dispositivo universal, mostrando mejores características analíticas que todos los nebulizadores incluidos en Figura III.7, con la excepción de los modelos VeeSpray[®] y Slurry[®], nebulizadores que están diseñados exclusivamente para la nebulización de muestras que contienen partículas en suspensión de tamaños mayores de 75 μm . Actualmente, el nebulizador OneNeb[®] está siendo producido por la casa comercial Ingeniatics Tecnologías (<http://www.ingeniatics.com>) y lo distribuye de forma exclusiva a nivel mundial la casa comercial Agilent Technologies como parte del equipamiento de sus espectrómetros de ICP-OES y MIP-OES [49-51].

III.1.4. Cámaras de nebulización

La eficiencia de transporte del aerosol se define como el porcentaje de masa de disolución nebulizada que realmente llega al plasma. Para que este porcentaje sea alto, y también para una rápida desolvatación, volatilización y atomización de las gotas del aerosol cuando alcancen el plasma, es necesario que el nebulizador produzca gotas monodispersas y de diámetro lo más pequeño posible. Generalmente la mayoría de los nebulizadores producen aerosoles primarios con una amplia distribución de tamaños de gotas (aerosoles polidispersos) con diámetros que van desde por debajo de 1 μm hasta 100 μm , o superiores. Por ello, tras el nebulizador, el siguiente dispositivo en un sistema de introducción de muestras líquidas es la cámara de nebulización, cuya principal finalidad es actuar como un “filtro” adecuando las características del aerosol generado por el nebulizador a los requerimientos de la fuente de atomización [17,52].

La cámara de nebulización tiene como función eliminar las gotas de mayor tamaño e igualar las velocidades de las gotas a la del gas portador eliminando las gotas con velocidades elevadas y haciendo el flujo lo más laminar posible. Por lo tanto, la cámara de nebulización actúa como un filtro de tamaños y velocidades, es decir, un filtro de cantidad de movimiento de las gotas del aerosol [53]. El aerosol que sale de la cámara de nebulización y es transportado al plasma a través del tubo inyector recibe el nombre de aerosol terciario.

Algunos parámetros utilizados para definir las características de una cámara de nebulización son: (i) Diámetro de corte (d_c), es característico de cada cámara y depende

de su diseño (i.e. forma y volumen interno). Las gotas que poseen un diámetro superior al valor de d_c de la cámara utilizada en el análisis serán eliminadas en los drenados; (ii) Tiempo de estabilización (“wash-in time”), se define como el intervalo de tiempo transcurrido desde que la muestra comienza a ser introducida hasta que la señal alcanza el 98% de su señal máxima; (iii) Tiempo de lavado (“wash-out time”), se define como el intervalo de tiempo transcurrido desde que se introduce el blanco o la disolución de lavado hasta que la señal alcanza el 1% de su señal máxima. Las características que debe reunir una cámara de nebulización ideal son [17]:

- Transportar la máxima cantidad de analito y mínima de disolvente;
- Amortiguar las fluctuaciones existentes en la generación del aerosol primario dando lugar a un aerosol terciario estable;
- Generar un aerosol terciario cuyas gotas puedan ser atomizadas completamente (d_c comprendido entre 1 y 7 μm);
- Utilizar un flujo gaseoso para transportar el aerosol lo más laminar posible y con pequeños gradientes de velocidad entre gotas (de diferente o igual tamaño) para que de esta manera el analito permanezca un tiempo de residencia óptimo en el plasma (i.e., que todas las gotas sufran los procesos de desolvatación, vaporización y atomización de forma similar para la misma zona del plasma);
- Resistente a disoluciones agresivas (ácidas, salinas y orgánicas, entre otras);
- Presentar poco o ningún efecto de memoria.

En base a estas características ideales se han diseñado y evaluado una gran variedad de geometrías de cámaras de nebulización tanto para ICP-OES como ICP-MS. También se han estudiado diferentes volúmenes internos y una amplia variedad de materiales para su fabricación (e.g., vidrio, polietileno, diferentes tipos de Teflón[®], Ryton[®]) con el fin de mejorar las características de las cámaras de nebulización como son la resistencia, los tiempos de lavado y los efectos de memoria.

Cuando el aerosol atraviesa las cámaras de nebulización comúnmente utilizadas en técnicas de plasma se puede perder hasta un 98-99% de la muestra nebulizada [54,55], valores que muestran la importancia del papel de la cámara de nebulización en un sistema de introducción de muestras líquidas. Los procesos que ocurren en el interior de la cámara de nebulización desde la generación del aerosol hasta que éste alcanza el plasma se denominan fenómenos de transporte. Como se ha comentado anteriormente,

el aerosol generado por el nebulizador se denomina aerosol primario. La distribución de tamaños de gota de dicho aerosol se conoce como distribución de tamaño de gota primaria (pDTG). En la misma se muestra alguna de las propiedades del aerosol primario (e.g., número, superficie, volumen) frente al diámetro de las gotas que lo constituyen. Las variaciones sufridas por el aerosol hasta alcanzar el plasma dependerán significativamente de la pDTG, así como del diseño y dimensiones del resto de dispositivos del sistema de introducción de muestras líquidas. El aerosol resultante de la cámara de nebulización se denomina aerosol terciario, y de sus características dependerá en gran parte la señal analítica finalmente obtenida [55].

Los fenómenos de transporte modifican las características del aerosol primario. Aunque cada proceso actúa de forma diferente, en conjunto, dicha modificación consiste en: (i) una disminución del tamaño medio de gota; (ii) una disminución de las turbulencias asociadas con el proceso de generación del aerosol; (iii) un equilibrio térmico y de carga y finalmente; (iv) una reducción del volumen líquido de aerosol introducido en el plasma. De este modo, los aerosoles terciarios presentan características (e.g., distribución de tamaño de gota terciaria, tDTG) más compatibles con los requerimientos del plasma que las que presentan los aerosoles primarios. El resultado es un aumento de la señal analítica y una mejora en la precisión debido a la menor carga de disolvente que llega al plasma y a una mejora en los procesos de desolvatación, vaporización y atomización de las gotas que contienen el analito. Sin embargo, los fenómenos de transporte pueden mostrar tanto efectos positivos como negativos sobre la señal analítica [56].

El desalojo de la disolución resultante de las gotas eliminadas se realiza mediante el drenaje. Igual de importante es un suministro continuo y constante de la muestra al nebulizador como el desalojo constante del drenaje de la cámara de nebulización. Para tal fin, el drenaje se hace actualmente mediante una bomba peristáltica que puede ser la misma que bombea la muestra hacia el nebulizador. Una velocidad de bombeo para el drenaje demasiado lenta o rápida puede producir inestabilidades en el interior de la cámara de nebulización que aumentarán el ruido empeorando la precisión del análisis [57,58].

En función del diseño de la cámara de nebulización, el cual determinará la dinámica de fluidos en su interior, se puede establecer la siguiente clasificación de las más utilizadas actualmente en espectrometría de plasma (Figura III.12):

- *Cámara de nebulización de doble paso tipo Scott (Figura III.12a):* La cámara de nebulización de doble paso, paso inverso o tipo Scott está formada por dos tubos concéntricos de los cuales el exterior está cerrado en su parte final. Sin embargo, el tubo interno tiene su parte final abierta lo que permite separar los dos flujos del aerosol que circulan en sentido opuesto, reduciendo las turbulencias y evitando la condensación del aerosol en el nebulizador. El aerosol debe recorrer el tubo interno, hacer un giro de 180° y recorrer aproximadamente la misma distancia en sentido contrario para ser finalmente introducido en la base del plasma. Las gotas con diámetro superior al d_c de esta cámara serán eliminadas en primer lugar por impactos contra las paredes del tubo interior (i.e., las gotas de mayor tamaño normalmente situadas en el exterior del cono del aerosol) y posteriormente por impactos inerciales contra la pared final de la cámara de nebulización. Solo las gotas de menor inercia, suficientemente pequeñas y con la velocidad adecuada, serán capaces de seguir las trayectorias del gas y realizar el giro de 180° requerido. El recorrido del aerosol a través de esta cámara es largo, hecho que favorece el proceso de evaporación del disolvente [17]. Al mismo tiempo, cuanto mayor es el tiempo que permanece el aerosol en la cámara de nebulización también serán mayores las pérdidas por gravedad [59,60];

- *Cámara de nebulización de paso simple (Figura III.12b):* consiste en una conducción horizontal con forma cilíndrica o cónica a través de la cual se hace pasar el aerosol. En las cámaras de paso simple la trayectoria del aerosol es mucho menos tortuosa que en las de doble paso. Las colisiones de las gotas contra las paredes internas de la cámara y la gravedad son las principales causas de pérdida del aerosol. El resultado es un transporte de gotas de mayor tamaño al plasma, lo cual puede conducir a un aumento de la señal analítica pero también a una degradación de la estabilidad-precisión de la señal [61] y al deterioro de las características térmicas del plasma como consecuencia de una carga excesiva de disolvente [62];

- *Cámara de nebulización de tipo ciclón (Figura III.12c):* En las cámaras de tipo ciclón el aerosol es introducido de forma tangencial a la pared de la misma y en su interior adquiere una trayectoria circular. En la cámara ciclón solo parte del aerosol impacta contra la pared lateral interna mientras que el resto es dirigido hacia el interior de la cámara donde no hay superficies de impacto. Por tanto, las pérdidas de muestra son menores que con la cámara de doble paso donde el

nebulizador está situado dentro de un tubo cilíndrico y toda la parte externa del cono del aerosol primario impacta contra las paredes del mismo. Como consecuencia, la cámara de tipo ciclón genera aerosoles terciarios ligeramente más gruesos que la cámara de doble paso [63,64]. No obstante, su eficiencia de transporte es mayor [30] obteniéndose un comportamiento analítico superior [63-68], menores efectos interferentes [69,70], menores tiempos de lavado [71], una mayor tolerancia a trabajar con suspensiones [68] y un mejor comportamiento analítico también en técnicas acopladas.



Figura III.12: Fotografías de cámaras de nebulización tipo: a) doble paso tipo Scott, b) paso simple, c) ciclón.

Un plasma analítico es muy sensible a parámetros tales como el aporte y la naturaleza tanto del gas de nebulización como del disolvente, fluctuaciones en la introducción del aerosol así como el tamaño medio de las gotas del aerosol terciario. Los diferentes tipos de cámara de nebulización indicados anteriormente se han fabricado con diversos materiales, modificando tanto su forma como su volumen interno, con el fin de mejorar su comportamiento. Sin embargo, no existe todavía un diseño de cámara de nebulización aceptado universalmente; se puede decir que para cada aplicación existe un diseño óptimo de cámara de nebulización. La escasez de modelos matemáticos que describan el comportamiento del aerosol en el interior de las cámaras de nebulización ha hecho que su diseño se realiza normalmente de una forma empírica [17].

En este sentido son especialmente interesantes los trabajos de Schaldach et al. [72-75]. Estos autores han simulado el transporte y la modificación del aerosol al atravesar cámaras de nebulización de doble paso [72,74] y tipo ciclón [73,75] mediante dinámica de fluidos computacional (“computational fluid dynamics”, CFD). CFD tiene en cuenta los principales fenómenos de transporte que tienen lugar en la cámara de nebulización y permite obtener información que no es accesible experimentalmente (e.g., las líneas del flujo de gas, el movimiento de las gotas y la deposición de las mismas en diferentes

partes de las paredes internas de la cámara). Además, CFD puede utilizarse como herramienta para evaluar los procesos que tendrían lugar en el interior de la cámara así como su intensidad, lo cual permitiría predecir el comportamiento analítico de la cámara y, por tanto, optimizar su geometría de una forma racional. Sin embargo, una simulación numérica todavía no puede eliminar la necesidad de construir y evaluar experimentalmente los prototipos, pero sí puede reducir considerablemente el número de pruebas requeridas [72-75].

III.1.5. Sistemas múltiples de introducción de muestras en plasmas

Recientemente ha surgido el interés por los sistemas de introducción de muestras líquidas basados en la combinación de más de un nebulizador y/o cámara de nebulización. Estos sistemas múltiples de introducción de muestras en plasmas permiten la introducción simultánea de una o varias disoluciones por distintas unidades de nebulización dentro de la cámara de nebulización. Actualmente existen tres combinaciones distintas: (i) sistemas que incorporan un nebulizador con varios orificios – nebulizador múltiple; (ii) sistemas que incorporan varios nebulizadores mediante entradas distintas en una cámara de nebulización modificada, y; (iii) sistemas que incorporan dos cámaras de nebulización distintas, cada una equipada con un nebulizador.

En todos los casos mediante el uso de estos sistemas se logra uno de los siguientes objetivos, o la combinación de ambos:

- Mejorar la sensibilidad analítica mediante el aumento del transporte del analito hacia el plasma. Dicho aumento se produce debido a una mejora en la pDTG de los aerosoles producidos por los distintos orificios de un nebulizador múltiple, o por la generación de especies volátiles de los analitos dentro de la cámara de nebulización mediante la mezcla de aerosoles;
- Realizar operaciones de calibración online como adición de patrón interno o mediante el método de adición de patrón dentro de la cámara de nebulización.

III.1.5.1. Sistemas que incorporan un nebulizador con varios orificios (nebulizador múltiple)

En un intento por mejorar la eficiencia de introducción de la muestra, Huang et al. [76] han introducido un nebulizador múltiple microespray (“multimicrospray nebulizer”) para MIP-MS. El prototipo propuesto (Figura III.13, [76]) incorpora tres orificios de nebulización, denominadas unidades de nebulización, incorporados en un cuerpo común.

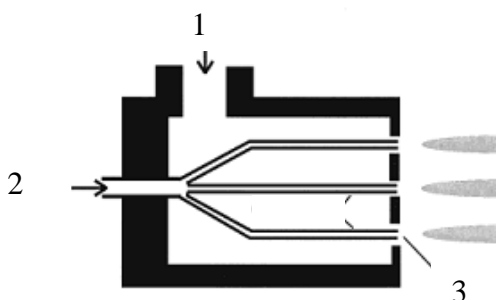


Figura III.13: Esquema del nebulizador múltiple microespray: 1, flujo de gas de nebulización; 2, flujo de muestra líquida; 3, unidad de nebulización [76].

Cada unidad de nebulización está compuesta por un orificio de 170 μm de diámetro y un capilar de sílice fundida de 50 μm de diámetro interno. Los resultados obtenidos con este nebulizador en MIP-MS muestran un aumento en las sensibilidades analíticas para As, Cr, Co, Cu y Mn, en comparación con un nebulizador concéntrico convencional. Por otro lado, las tres unidades de nebulización poseen una toma de muestra común lo que limita el uso del nebulizador a la introducción de una sola disolución.

Un nebulizador múltiple de flujo cruzado ha sido desarrollado recientemente por Bauer et. al. [77]. El dispositivo consiste en un nebulizador de flujo cruzado modificado al que se le ha añadido un segundo canal de toma de muestra líquida (Figura III.14, [77]). De esta forma el nebulizador propuesto tiene dos entradas de muestra líquida y una entrada de gas de nebulización común.

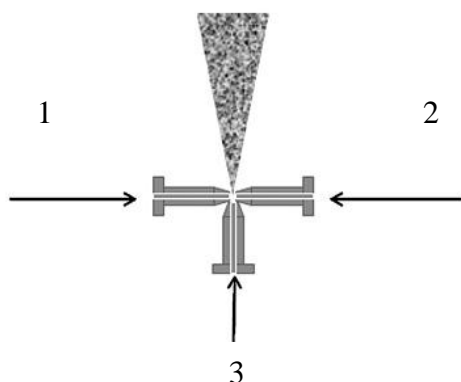


Figura III.14: Esquema del nebulizador múltiple de flujo cruzado: 1, toma de patrones de calibración acuosos; 2, toma de muestra orgánica; 3, toma de gas de nebulización [77].

El nebulizador múltiple de flujo cruzado ha sido utilizado en el análisis de muestras orgánicas mediante calibración con patrones acuosos, usando para ello una calibración mediante adición de patrón. Debido a las diferentes propiedades físicas de los patrones y las muestras estudiadas, la eficiencia de nebulización es notablemente distinta para las disoluciones orgánicas y acuosas. Por ello, se ha aplicado un procedimiento matemático con el fin de compensar dichas diferencias.

III.1.5.2. Sistemas que incorporan varios nebulizadores mediante entradas distintas en una cámara de nebulización modificada

Gómez et al. [78] han evaluado un sistema de introducción de muestras líquidas provisto de dos nebulizadores para la generación de hidruros volátiles en ICP-OES. El sistema consiste en dos nebulizadores neumáticos (de flujo cruzado y concéntrico convencional) conectados a una cámara de nebulización de doble paso mediante un adaptador en forma de “T”. Este sistema proporciona mejores relaciones señal/fondo, límites de detección y precisiones en la determinación de As, Hg, Sb y Se que nebulizadores convencionales como el ultrasónico o el de flujo cruzado. El nuevo sistema también permite la determinación de elementos que no forman hidruros volátiles, aunque las figuras de mérito obtenidas son peores a las obtenidas con el sistema convencional. Los mismos autores han propuesto un dispositivo que consiste en una cámara ciclónica modificada la cual permite el uso simultáneo de dos micronebulizadores [79]. La Figura III.15 ([79]) muestra una fotografía del sistema de introducción de muestras de doble nebulizador. Las figuras de mérito obtenidas con este

dispositivo son similares a las de un micronebulizador acoplado a una cámara de nebulización ciclónica convencional. Así, la sensibilidad y los límites de detección son mejorados mientras que la precisión empeora, probablemente debido a las turbulencias que se producen en el interior de la cámara cuando se mezclan los aerosoles de ambos micronebulizadores. Las interferencias no espectrales, normalmente presentes cuando se trabaja con caudales líquidos bajos, son compensadas utilizando la técnica de calibración en paralelo. Dicho sistema ha sido utilizado con éxito para la determinación de As, Sb y Se mediante generación de hidruros [79].



Figura III.15: Cámara de nebulización de tipo ciclón con dos entradas de nebulización [79].

Asfaw y Wibetoe. [80] han desarrollado una cámara de nebulización con tres modos de funcionamiento: (i) nebulización, (ii) generación de vapor (hidruros o vapor frío) y, (iii) ambos juntos (modo doble). El sistema consiste en una cámara de nebulización de tipo ciclón fabricada en polipropileno y un nebulizador de flujo paralelo tipo Mira Mist (Figura III.16, [80]). La cámara ha sido modificada añadiéndole dos aberturas en el cuerpo fabricadas en PEEK. En total hay cinco orificios cada uno destinado a una función diferente: acople del nebulizador (posición 1), introducción de la muestra para la generación del vapor (posición 2), introducción de la disolución reductora (posición 3), conexión con el inyector de la antorcha (posición 4) y drenaje (posición 5). El sistema es resistente al HF y su comportamiento analítico es superior al de un sistema convencional en la determinación de As y Hg en el modo de generación de hidruros y de vapor frío, respectivamente. Para el resto de elementos, las figuras de mérito obtenidas son similares al sistema convencional en ICP-OES y ligeramente más altas en ICP-MS [80].

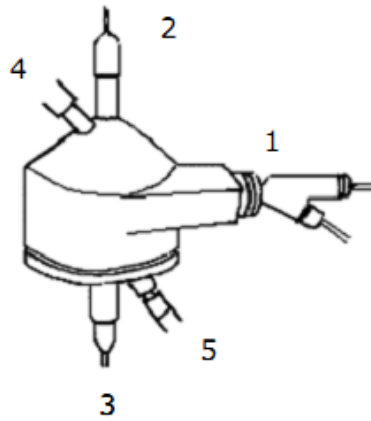


Figura III.16: Sistema de introducción de muestras de modo triple: 1, acople del nebulizador; 2, introducción de la muestra para la generación del vapor; 3, introducción de la disolución reductora; 4, conexión con el inyector de la antorcha y; 5, drenaje[80].

Recientemente, la casa comercial Marathon Scientific ha introducido un sistema múltiple de introducción de muestras similar, denominado “Multimode Sample Introduction System” (MSIS) (Figura III.17, [81]). Dicho dispositivo permite la generación de hidruros dentro de la cámara de nebulización mediante la introducción de la muestra en forma de aerosol, mediante nebulización, o en fase gas, mediante la formación de hidruros sobre una lámina líquida fina [81].

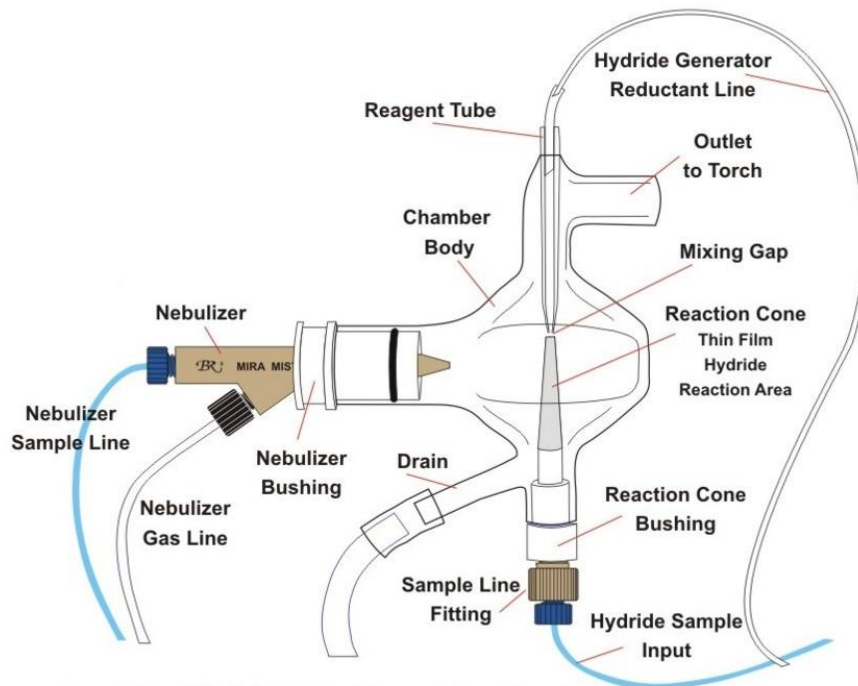


Figura III.17: “Multimode Sample Introduction System” (MSIS)[81].

III.1.5.3. Sistemas que incorporan dos cámaras de nebulización distintas, cada una equipada con un nebulizador

Huxter et al. [82] han desarrollado un método de calibración en “paralelo” que consiste en la introducción de la muestra y el patrón de forma simultánea al plasma mediante el uso de dos sistemas independientes que trabajan en paralelo. Cada sistema dispone de un propio nebulizador neumático, el que transporta la muestra es de flujo cruzado y el que transporta el patrón es de tipo concéntrico. La cámara de nebulización en ambos casos es de doble paso. Los dos sistemas están conectados al inyector de la antorcha mediante un adaptador en forma de “Y”. La diferencia fundamental con el método de calibración por adición patrón tradicional es que la adición del patrón no se realiza a la muestra directamente sino en el tubo que transporta los aerosoles al plasma.

III.2. Objetivo y plan del trabajo experimental del capítulo 2

III.2.1. Objetivo

Considerando la problemática de los sistemas de introducción de muestras líquidas actualmente disponibles y las excelentes posibilidades ofrecidas por el mecanismo de nebulización “Flow Focusing”[®] el objetivo general para el trabajo experimental fue:

Construir un nuevo nebulizador múltiple basado en la tecnología “Flow Focusing”[®] constituido por un solo cuerpo en el cual puede haber más que un sistema de nebulización Seguidamente, dicho nebulizador múltiple será evaluado para la mejora de la eficacia de nebulización y/o el desarrollo de nuevas metodologías de preparación de la muestra dentro de la cámara de nebulización de los sistemas de introducción de muestras líquidas de los espectrómetros atómicos basados en ICP.

III.2.2. Plan de trabajo

El plan de trabajo desarrollado en la presente investigación consta de los siguientes apartados:

- Diseñar y construir el prototipo de nebulizador múltiple basado en la tecnología “Flow Focusing”[®].
- Caracterización de los aerosoles producidos por los distintos orificios del prototipo (medición de distribución de tamaño y de velocidad de las gotas de los aerosoles primarios);
- Diseño y construcción de una cámara de nebulización dedicada y caracterización de los aerosoles terciarios;
- Optimización de las variables de nebulización del prototipo (flujo de muestra líquida y de gas de nebulización). Obtención de las características analíticas del sistema en ICP-OES;
- Aplicación del nebulizador múltiple y la cámara de nebulización dedicada al análisis de muestras de referencia certificadas utilizando para ello calibración externa asimismo nuevas metodologías de calibración mediante adición de estándar en línea.

III.3. Resultados experimentales: Development and characterization of a Flow Focusing[®] multi nebulization system for sample introduction in ICP-based spectrometric techniques

III.3.1. Introduction

Inductively coupled plasma (ICP)-based analytical techniques are nowadays considered state of the art in element analysis. Despite this, both inductively coupled plasma- atomic emission spectrometry (ICP-OES) and inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) are subject to continuous research, aiming to improve their analytical and operational characteristics. One of the most active fields of this research deals with the evolution of the liquid sample introduction systems.

The majority of the conventional nebulizers work at high sample uptake rates and produce polydisperse (both in size and velocity) aerosols. This is why the spray chamber acts like a filter, narrowing the drop size and velocity distributions of the termed tertiary aerosols by elimination of the large, too fast and/or too slow droplets. As a result, only a small fraction of the sample reaches the plasma, the rest being drained by the spray chamber. In order to reduce these problems, new nebulizers were developed and commercialized in the past decades. Among them, the high efficiency nebulizer (HEN) [83-85], the microconcentric nebulizer (MCN) [86], the hydraulic high pressure pneumatic nebulizer (HHPN) [87,88], the single-bore high-pressure pneumatic nebulizer (SBHPPN) [89-91], the oscillating capillary nebulizer (OCN) [92], the sonic-spray nebulizer (SSN) [93], the direct injection nebulizer (DIN) [94,95], and the direct injection high efficiency nebulizer (DIHEN) [96,97], can be cited. However, all these nebulizers still show some limitations. Few years ago, the Flow Focusing (FF) principle [39] was introduced in the field of the liquid sample introduction in ICP-based [43,44,46] and microwave induced plasma (MIP)-based [45] atomic spectrometry. The FF principle has been successfully applied in the construction of various conventional nebulizer prototypes and has proven to be an effective mean to obtain very fine and monodisperse aerosols. This allows high quantities of aerosol to be transported into the plasma, resulting in high sensitivities and low detection limits [43-46].

In another attempt to improve the nebulization efficiency Huang et al. introduced a multimicrospray nebulizer for MIP-MS [76]. The prototype described possesses three

“nebulization units” incorporated in a single body. An increase on the sensitivities of the analytical signals in comparison with a single orifice nebulizer using the same mechanism for nebulization was reported. On the other hand, the prototype described has a common liquid inlet that did not allowed different solutions to be nebulized at the same time which restricts the application possibilities of the nebulizer only to “conventional” nebulization. In this work, a new multiple nebulizer for liquid sample introduction in ICP-based spectrometers was developed and characterized on an ICP-OES. The association of the Flow Focusing multiple nebulizer (FFMN) and a dedicated spray chamber is called Flow Focusing multi nebulization system (FFMNS). In contrast to the multimicrospray nebulizer mentioned above, the prototype described here has separate liquid sample ducts for each nebulization nozzle. The advantages of constructing a multi-nebulizer consisting in various independent nozzles based on the FF principle could be scrutinized in two main aspects. First, both the theoretical fundamentals and the experimental data with “conventional” FF prototypes show that lower liquid uptakes lead to finer and, especially, more monodisperse primary aerosols [43-45]. Therefore, combining few nebulizing nozzles in a single body should result in a higher quantity of primary aerosol with appropriate characteristics to reach the plasma through the spray chamber. On the other side, having multiple independent nebulizing nozzles permits the simultaneous introduction in the spray chamber of aerosols from different solutions (sample, solvent, standard solutions), opening a new way of performing “in-chamber” analytical procedures [78,79,82,98-101] (i.e., dilution, derivatization, addition of internal standard, standard addition, etc.) that normally are the most time consuming part of the sample preparation process in many methods of analysis by plasma-based techniques.

Therefore, the main aim of the present work was to evaluate the behavior of the new Flow Focusing multiple nebulizer in ICP-OES. To this end, four dedicated spray chamber designs suitable for the dimensions of the nebulizer were tested. The primary and tertiary aerosol characteristics of the FFMN coupled to the best performing spray chamber were studied together with the solvent and analyte transport rate values for a range of nebulizing gas and liquid sample flows. The performance of this new sample introduction system (i.e., Flow Focusing multi nebulization system, FFMNS) in ICP-OES was optimized and the analytical figures of merit were determined and compared to those obtained with a standard sample introduction system for model solutions and

certified reference materials. Additionally, a preliminary study of the possibility to use the FFMN to “in chamber” sample preparation was done by applying it to on-line standard addition by aerosol mixing.

III.3.2. Experimental

III.3.2.1. Nebulizer description

A photograph and a **schematic** diagram of the prototype described in this work are shown in Figure III.18 a and b, respectively.

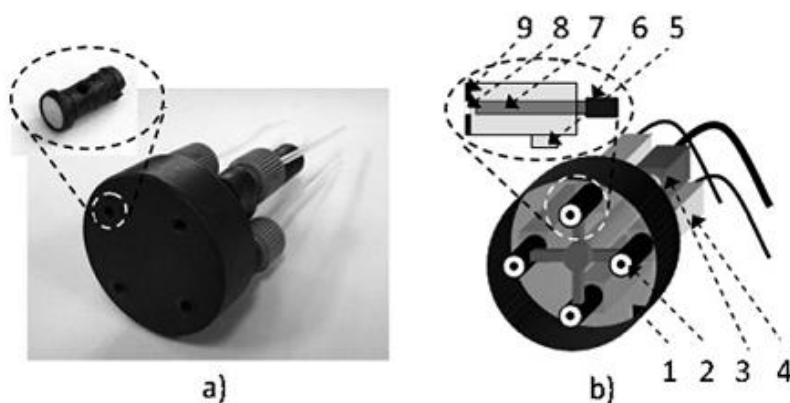


Figure III.18: Photograph (a) and schematic representation (b) of the FFMN prototype and the FF nozzles: 1—nebulizer body, 2—FF nebulization nozzle, 3—common gas inlet, 4—individual liquid sample inlet, 5—FF nozzle gas entrance, 6—liquid sample supply tube, 7—fused silica capillary, 8—FF nozzle exit hole, 9—Pt plate.

The main body of the nebulizer (1) is a cylindrical piece with a 38 mm diameter and 10 mm length made of Teflon with 25% graphite. This material was chosen after being tested for chemical resistance to commonly used inorganic acids and organic solvents. Inside the main body, four FF nebulization nozzles (2), a common gas inlet (3) and four liquid uptake inlets (4) are incorporated. The common nebulization gas inlet (3) is cross-divided to four channels inside the nebulizer body that lead it to the individual gas inlets (5) of the four nebulization nozzles. Each nozzle has a separate liquid uptake tube (6). Each nozzle is situated at 10 mm from the nebulizer’s axis. A shorter distance was not possible to achieve due to technical difficulties in the construction of the prototype. The hydrodynamic principles and main features of the FF nebulization nozzles have been previously reported [39,43]. The nebulization nozzles used in this prototype have

been constructed as follows: the nebulizing gas is provided by the inlet (5) and the sample is pumped through inlet tube (6). This is connected to a standard fused silica capillary (7) of 50 mm id. The capillary tip is precisely positioned with respect to the exit hole (8) at a distance of 100 mm. The exit hole has a diameter of 100 mm and is drilled on a platinum plate (9) that forms the front part on the nebulization nozzle.

The four nozzles were provisory numbered (nozzle 1–4, clockwise) in order to distinguish them during the nebulizer characterization studies.

If not otherwise mentioned, the terms liquid flow (Q_l) and nebulizing gas flow (Q_g) used here correspond to the total flows through the FFMN per minute and not to the individual flows for each nebulizing nozzle.

III.3.2.2. Dedicated spray chamber design

The nebulizer prototype described in this work has dimensions that do not permit its direct connection to the conventional spray chambers used in the sample introduction systems of the ICP-based spectrometers. Thus, a dedicated spray chamber had to be made. Four different designs were evaluated (schemes with the main dimensions are shown on Figure III.19: a horn type spray chamber (Figure III.19 a), a Scott type double pass spray chamber (Figure III.19 b), a single pass (“on axis”) spray chamber (Figure III.19 c) and a single pass Scott (“off axis”) spray chamber (Figure III.19 d) with volumes of 170 mL, 190 mL, 95 mL, and 130 mL, respectively. All of them were made of borosilicate glass in the workshop facilities at the University of Alicante. The nebulizer was connected to the spray chambers via a home-made Teflon ring connector. Furthermore, the chambers “on axis” (2c) and “off axis” (2d) were designed to have adjustable length (and volume) in order to optimize its influence on the analytical signal. The adjustable length was achieved by two cylindrical borosilicate glass extensions of 2 and 4 cm length (25 and 50 mL volume), respectively, and the same id (5 cm) like the spray chambers. These were placed between the original spray chambers and the Teflon ring connector using adhesive tape.

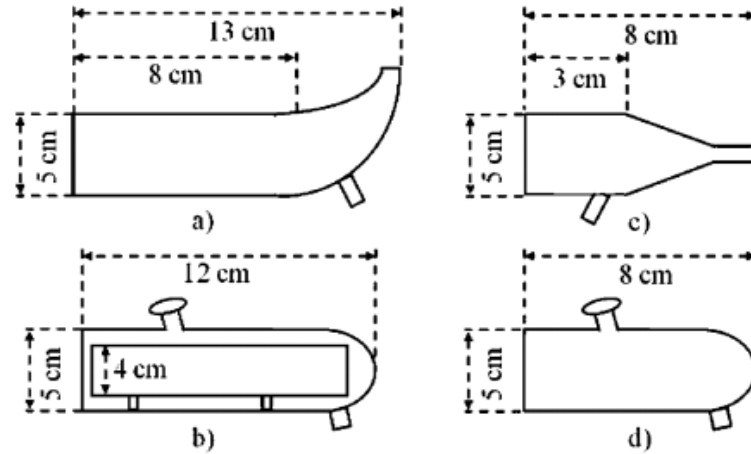


Figure III.19: Schemes with the main dimensions of the spray chamber prototypes: (a) horn type; (b) Scott type double pass; (c) “on axis” single pass; (d) “off axis” Scott type single pass. The volumes are 170 mL, 190 mL, 95 mL and 130 mL, respectively.

III.3.2.3. Drop size and velocity measurement instrumentation

Drop size and axial velocity distributions of the aerosols were determined using a two-dimensional phase Doppler particle analyzer (2D-PDPA, TSI Inc., Shoreview, MN, USA) [45,102] equipped with data acquisition software (FlowSizer v. 2.0.1.0, TSI Inc., Shoreview, MN, USA). The primary aerosol was measured 3 mm from each nozzle along the centerline of the aerosol cone. It should be mentioned that PDPA measurements on axis of the aerosol cone may not be representative of the aerosol at off axis positions. The tertiary aerosol was measured 1 mm from the exit of the spray chambers used and at the centerline of the chamber exit. In each PDPA acquisition experiment, approximately 10 000 droplets were measured. The parameters to be set in the PDPA system (i.e., detector voltage, burst threshold, band pass filter, downmix frequency, intensity validation, etc.) were optimized separately for each measurement, following strictly the producer’s recommendations for this type of samples [103]. All the measurements were done in triplicate, with standard deviations not exceeding 1%.

III.3.2.4. ICP-OES instrumentation

An optical emission spectrometer (model Optima 4300DV PerkinElmer, Norwalk, CT, USA) was used for the evaluation of the FFMN. The Optima 4300 is a dual view instrument that can perform measurements either axially or radially with the ICP torch positioned horizontally in the sample compartment. The whole sample introduction

system is located outside the instrument providing an easy access and avoiding heating by the RF generator and the plasma. Thus, the nebulization system remained at room temperature. A standard quartz torch for aqueous solutions with a ceramic injector of 1.2 mm id and 14 cm length was used throughout. For the evaluation of the prototype described in this work, the argon gas for nebulization was provided by an external cylinder and the flow was controlled with a pressure regulator (Bosch GmbH, Stuttgart, Germany) with a connected manometer (model Digitron 2003P, Sifam Instruments Limited, Torquay, England). The liquid sample flow was provided and controlled by a four-channel peristaltic pump (model Mini Plus 3 Gilson Inc., Villiers le Belle, France). Each channel of the pump supplied one nozzle of the nebulizer. The ICP-OES performance of the multinebulization sample introduction system (FFMN-dedicated spray chamber) was compared against a commonly used conventional system consisting of a concentric pneumatic nebulizer (model Conikal, Glass Expansion Ptr. Ltd, West Melbourne, Victoria, Australia) attached to a cyclonic spray chamber (model Tracy, Glass Expansion Ptr. Ltd, West Melbourne, Victoria, Australia) of 50 mL volume. In this case, the argon nebulizing gas was provided directly by the ICP-OES instrument and the liquid sample was driven by the same peristaltic pump, like with the FFMN system. The common instrumental settings for the measurements performed are presented in Table III.2. A representative set of atomic and ionic lines with E_{sum} between 1.62 eV and 15.40 eV were studied (Table III.3).

Table III.2: Operating conditions of the ICP-OES instrument

Instrument condition	Value
Outer gas flow rate, L min ⁻¹	15
Intermediate gas flow rate, L min ⁻¹	0.2
Nebulizer-carrier gas flow, L min ⁻¹	Variable
RF power, W	1300
Nominal frequency, MHz	40
Liquid flow rate, mL min ⁻¹	Variable
Spray chamber	Variable
Integration time, s	0.1
Read time, s	1
Number of replicates	5
Viewing mode	Radial and axial
Observation height in radial mode/mm	Variable

Figures of merit were obtained under the optimum conditions for each sample introduction system, using aqueous solutions containing 0.5 M HNO₃ and 2 mg L⁻¹ of

each of the elements in radial view mode, and 0.5 mg L⁻¹ of each of the elements in axial view mode.

Table III.3: Energy values for the emission lines studied

Line type	Element	Wavelength, nm	E _{ion} , eV	E _{exc} , eV	E _{sum} , eV
Atomic	K I	766.490	(4.34)	1.62	1.62
	Cu I	327.393	(7.73)	3.82	3.82
	Li I	610.362	(5.39)	3.88	3.88
	Zn I	213.857	(9.39)	5.80	5.80
	Mg I	285.213	(7.65)	4.35	4.35
	Cd I	228.802	(8.99)	5.42	5.42
Ionic	Sr II	421.546	5.69	2.94	8.63
	Ba II	233.527	5.21	6.01	11.22
	Mn II	257.610	7.44	4.81	12.25
	Cr II	267.716	6.76	6.16	12.92
	Fe II	238.204	7.87	5.20	13.07
	Ni II	221.647	7.64	6.63	14.27
	Pb II	220.353	7.42	7.37	14.79
	Zn II	206.200	9.39	6.01	15.40

^aE_{sum} = ionization energy (E_{ion}) + excitation energy (E_{exc}).

III.3.2.5. Solvent and analyte transport rate measurements

Solvent and analyte transport rate measurements were performed by means of direct methods [54]. The solvent transport rate (S_{tot}) was measured by adsorption of the tertiary aerosol in a U-tube filled with silica gel during a 5 minutes period. The S_{tot} values were derived by weighing the tube before and after the aerosol exposure. The analyte transport rate (W_{tot}) was obtained by collecting the tertiary aerosol on a glass-fibre filter (Type A/E, 47 mm diameter, 0.3 mm pore size; Gelman Sciences, Ann Arbor, MI, USA) placed in front or above the spray chamber (depending on the design evaluated). A 500 mg L⁻¹ Mn solution was nebulized. The Mn retained after a period of 5 minutes was extracted with 1.0% (w/w) hot nitric acid. The total solution volume was adjusted up to 25 mL in a volumetric flask. Finally, the Mn concentration in each solution was determined by flame atomic absorption spectrometry. The values given for both S_{tot} and W_{tot} are the mean of three replicates, with standard deviations of less than 10%.

III.3.2.6. Reagents

For ICP-OES measurements, 2.0 mg L⁻¹ and 0.5 mg L⁻¹ multielement standard solutions were prepared by diluting 1000 mg L⁻¹ stock solution (ICP Multi Element Standard Solution IV, CetriPUR, Merck, Darmstadt, Germany) with 0.5 M HNO₃ prepared from 65% high-purity acid (Merck, Darmstadt, Germany) in distilled deionized water. All solutions were previously filtered with membrane filters of 0.45 mm pore size (Millipore, Billerica, MA, USA). The certified reference materials analyzed were LGC 6010 “hard drinking water (UK) - metals” and LGC 6016 “estuarine water” (LGC Deselaeres S.L., Middlesex, UK). Distilled deionized water (18.3MΩ cm) was used for collection of the aerosol diagnostic data.

III.3.3. Results and discussion

III.3.3.1. Dedicated spray chamber optimization

Four spray chambers with different designs suitable for the dimensions of the FFMN were evaluated in ICP-OES. For all, the spray chamber optimization experiments and the ICP-OES measurements were carried out in radial view mode. The ICP observation height above the load coil (ALC) and the nebulizer working conditions (Q_g and Q_t) were the optimum for each spray chamber (i.e., conditions for the highest ICP-OES signal for the majority of the emission lines evaluated). An initial test of the four chambers showed that the analytical signals obtained with the single pass (“on axis”) and the Scott single pass chambers (Figure III.19 c and d, respectively) were significantly superior, with signal sensitivities between one and two orders of magnitude higher than those obtained with the horn type and Scott double pass chambers (Figures III.19 a and b). The low sensitivity obtained with these chambers was mainly due to an excessive aerosol drain, clearly seen even by visual inspection. For this reason, the horn type and Scott type double pass chambers were rejected for their further use with the FFMN.

The length (and volume) of the “on axis” single pass and the Scott single pass spray chambers were then optimized by placing the above mentioned glass extension cylinders between the chamber and the Teflon ring connector. Figure III.20 shows the sensitivity variation of the Mn II (257.610 nm) emission line for the two spray chambers when increasing the chambers length from 8 cm to 14 cm. The same trend was observed

for the majority of the emission lines evaluated. The strong influence of the distance between the nebulizer and the exit of the “on axis” single pass spray chamber could be explained by looking at the behaviour of the aerosol particles’ mean velocity at different distances from the nebulizer. The primary aerosol mean velocity, expressed as the mean data for the four nozzles, decreases when moving away from the nebulizer: 64 m s^{-1} , 10 m s^{-1} , 4.8 m s^{-1} and 3.3 m s^{-1} at 3 mm, 30 mm, 50 mm and 70 mm from the nebulizer, respectively. The increase in the chamber length permits a higher number of aerosol droplets to leave the chamber without striking on its frontal wall. On the other hand, the decrease of the signal with the 14 cm length chamber could be probably due to an excessive decrease in the axial velocity of some droplets that results in their condensation over the bottom wall of the spray chamber before they reach the exit (i.e., gravitational losses) [59]. The chamber length variation has a much lower effect on the “off axis” Scott type spray chamber, which could be due to its design with the tertiary aerosol exit above the axis of the primary aerosol cone. Finally, the single pass “on axis” spray chamber with 12 cm of total length was chosen for the connection of the FFMN to the ICP-OES spectrometer. The association of the Flow Focusing multiple nebulizer and the “on axis” spray chamber was called Flow Focusing multi nebulization system (FFMNS).

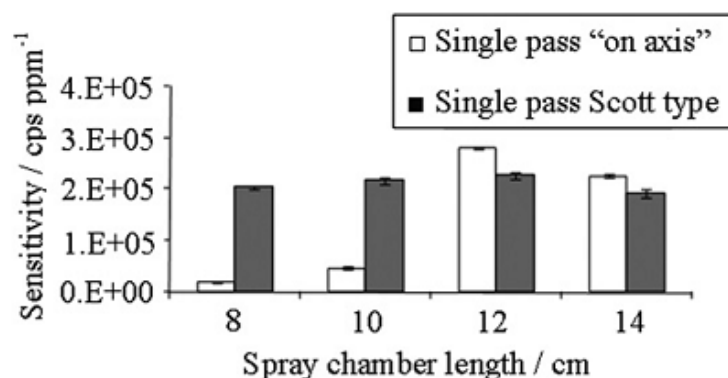


Figure 3.20: Effect of the spray chamber length on the ICP-OES signal sensitivity; Mn 257.610 emission line; Q_g : 0.8 L min^{-1} ; Q_l : 0.2 mL min^{-1} .

III.3.3.2. Individual nozzle performance

In an ideal case, the four nozzles of the multinebulizer characterized should show an equal performance. Yet, for a real hand-made prototype, some differences in the way they work are to be expected.

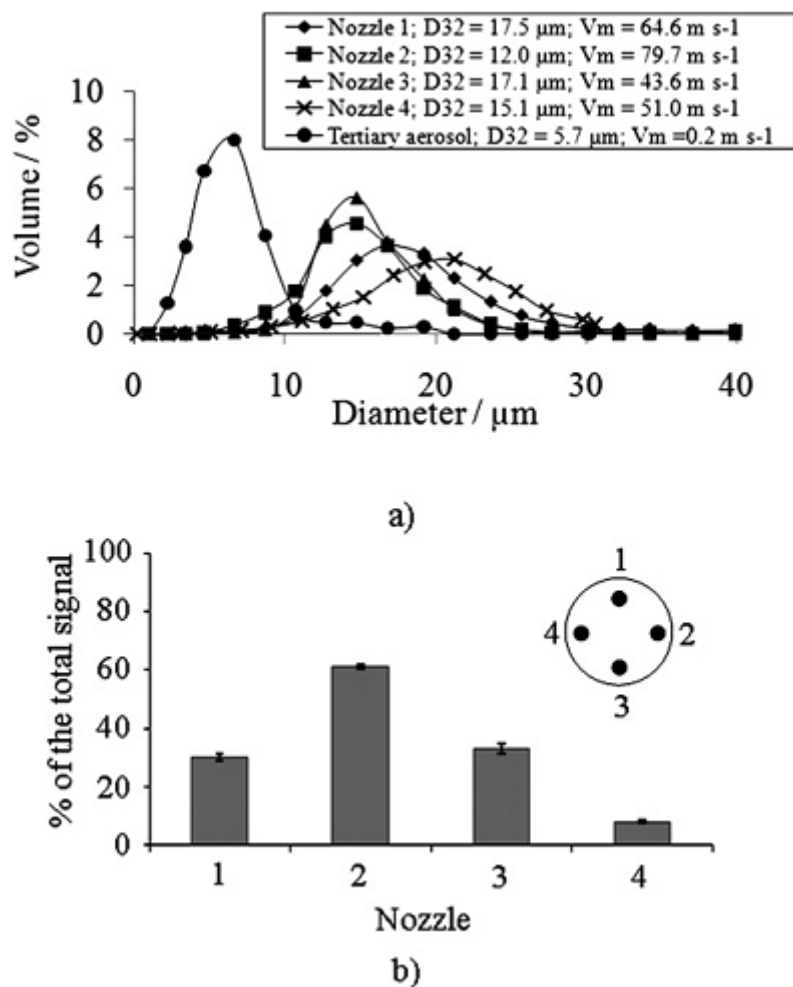


Figure III.21: (a) Primary drop size distributions from the different nozzles of the FFMN and comparison with a tertiary aerosol; (b) individual contribution of the different nebulizing nozzles of the FFMN to the total ICP-OES signal ($\text{Mn II } 257.610 \text{ nm}$ emission line). All the data are for equal nebulization conditions: Q_g : 0.8 L min^{-1} ; Q_l : 0.05 mL min^{-1} per nozzle (total liquid flow of 0.2 mL min^{-1}). The scheme shows the relative position of each nozzle. Single pass “on axis” spray chamber with 12 cm of total length was used, (see text for explanation).

Figure III.21 a shows the individual primary drop size distributions of aerosols from each nebulization nozzle under equal nebulising conditions (0.8 L min^{-1} total gas flow and 0.05 mL min^{-1} liquid flow per nozzle). The tertiary drop size distribution of the multilinebulizer when connected to the single pass “on axis” spray chamber is also showed for comparison. A common representation of the overall generated primary aerosol was not possible because of the distance between the nebulization nozzles—at 3 mm from the exit holes, the aerosol cones are integral and do not overlap. As shown in this figure, the primary drop size distributions are quite different for the different nozzles, with Sauter mean diameters (D_{32}) of 17.5 mm, 12.0 mm, 17.1 mm and 15.1

mm, for nozzles 1, 2, 3 and 4, respectively. The small liquid flow uptake differences between the nozzles and the PDPA measurement uncertainty could not explain this difference (16% RSD). On the other hand, the mean axial velocity of the primary aerosols was also found to be different for the different nozzles (see data on Fig. 4a), which is probably due to small differences in their internal geometry.

The tertiary aerosol drop size distribution shown in Fig. 4a indicates that the cut-off diameter of the spray chamber used with the nebulizer is approximately 10 mm, so aerosol droplets larger than this diameter are drained by the spray chamber and do not reach the plasma. Once in the plasma, droplets larger than 8–10 mm diameter do not contribute significantly to the analytical signal but contribute negatively to noise due to their incomplete desolvation and vaporization [104,105]. The percentage of the aerosol volume smaller than 10 mm is 2.2%, 7.9%, 2.1% and 1.5% for the nozzles 1, 2, 3 and 4, respectively. Thus, the expected individual contributions to the total analytical signal should be highest for the aerosols generated by nozzle 2, similar for those by nozzles 1 and 3 and lowest by nozzle 4. The individual contribution of each nozzle to the total analytical signal in ICP-OES is shown in Figure III.21 b. This study was performed by nebulizing sample solutions consecutively through each nozzle. At the same time, the other three nozzles were nebulizing water, in order to keep constant the overall gas and liquid loads to the plasma. The total gas flow (Q_g) and the total liquid flow (Q_l) were 0.8 L min^{-1} and 0.2 mL min^{-1} , respectively. Figure III.21 b shows the relative signal of the Mn II (257.610 nm) emission line obtained from the different nozzles in radial view mode. The same trend was observed for the rest of emission lines studied. The results on this figure show that the contribution to the total analytical signal is highest for nozzle 2 (61%), almost equal for nozzles 1 (30%) and 3 (33%) and lowest for nozzle 4 (8%), which is in good agreement with the conclusions drawn above from the primary and tertiary aerosol distributions study. It should be mentioned here, however, that in the case of nozzle 4, according to a visual inspection, the aerosol cone was not completely perpendicular to the nebulizer front surface, but slightly tilted towards the periphery. This fact increases the aerosol losses in the spray chamber due to collisions of the aerosol droplets against the chamber walls [59].

III.3.3.3. Nebulization parameters characterization

III.3.3.3.1. Nebulizing gas flow.

The ICP efficiency (i.e., the limits of detection) is very sensitive to the nebulizing gas flow, since it is related to both the plasma stability (which reflects on the signal precision) and the residence time of the analyte species inside the plasma (that influences on the analytical signal sensitivity). Having various nebulizers combined in one body multiplies the nebulizing gas flow, if the same pressure is maintained upstream as in the case of a single nebulizer. High nebulizing gas flows are unfavorable for the desolvation, vaporization, atomization/ionization and excitation performance of the plasma restricting the maximum working pressure of a multinebulization device. The prototype described here partially surmounts this drawback by means of the high efficiency of the FF principle of nebulization that requires lower pressure than other nebulization mechanisms to generate aerosols with characteristics suitable for the requirements of the ICP [39,44].

For the nebulizing gas flow optimization, the values were ranged between 0.6 L min^{-1} and 0.9 L min^{-1} (back pressure 0.76–1.21 bar), since commonly the optimal gas flows for the Optima 4300 ICP-OES tend to be between 0.7 and 0.8 L min^{-1} . Sample uptake was maintained at 0.5 mL min^{-1} except for the transport rate measurements where it was 0.2 L min^{-1} .

Figure III.22 a presents the evolution of the primary drop size distributions of the aerosol volumes generated by one of the nozzles (similar trends are observed for the other nozzles) when increasing the Q_g . As shown, increasing the Q_g does not result in significant changes in the drop size distributions between 0.7 and 0.9 L min^{-1} . Looking at the data of solvent transport rate (S_{tot}) and analyte transport rate (W_{tot}) shown in Figure III.22 b, it could be concluded that an increase in the nebulizing gas flow will lead to an increase in the ICP-OES analytical signal, since the analyte transport parameters increase with the nebulizing gas flow. The ICP-OES analytical signals are presented at Figure III.22 c. Here, only a reduced set of emission lines with different E_{sum} values is shown for clear visualization. The ICP measurements were carried out in radial view mode and the observation height ALC was optimized for each nebulizing gas flow. From Figure III.22 c it can be observed that for almost all the emission lines

evaluated, the sensitivity increases when increasing the nebulizing gas flow rate from 0.6 L min^{-1} to 0.8 L min^{-1} .

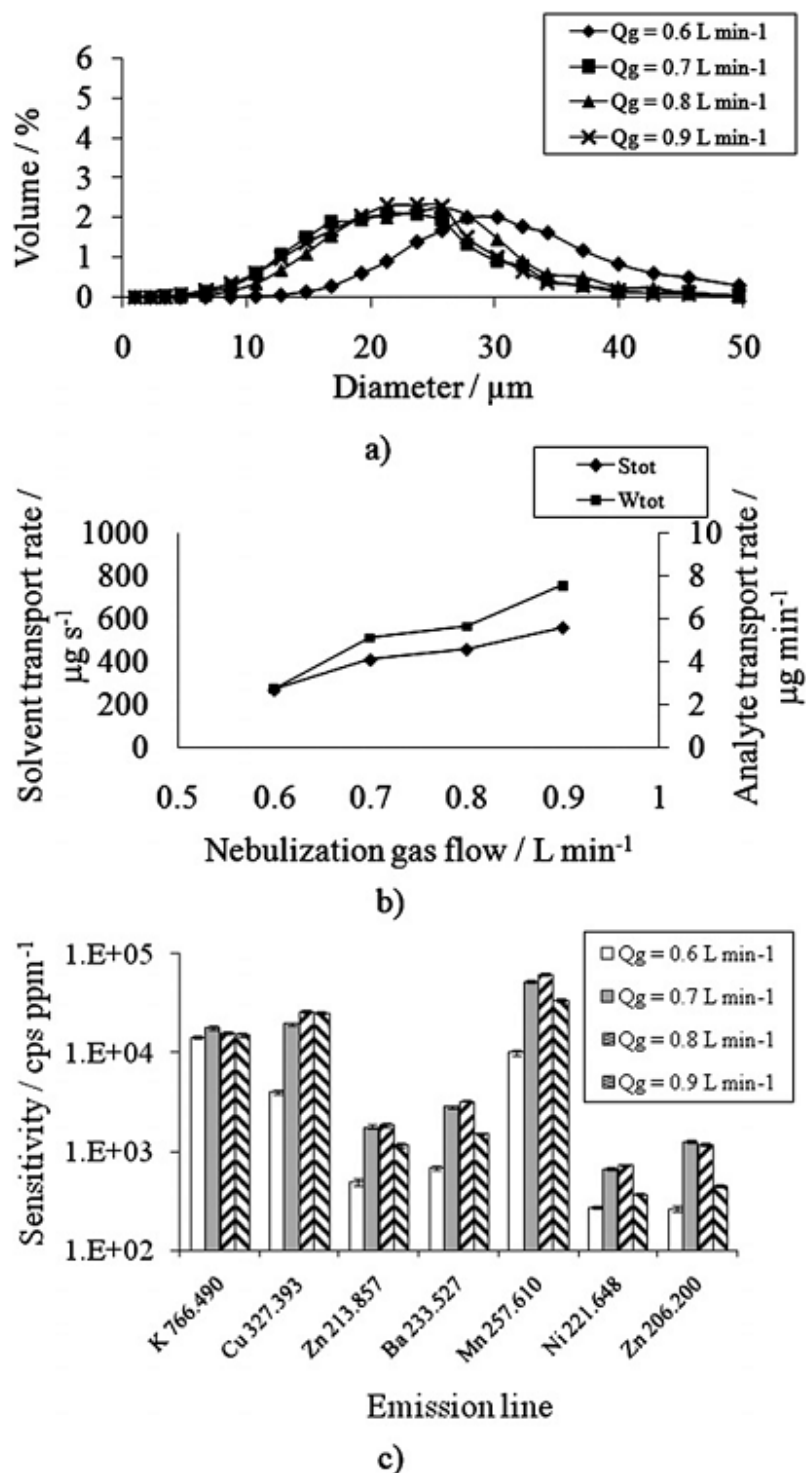


Figure III.22: Influence of the Q_g on: (a) drop size distributions of the aerosols generated with the FFMN (data for nozzle 1); (b) solvent and analyte transport rates; (c) ICP-OES sensitivity ('y' axis is in logarithmic scale for easier visualization). Q_i : 0.5 mL min^{-1} for (a) and (c) and 0.2 mL min^{-1} for (b) (see text for explanation).

However, at 0.9 L min^{-1} , sensitivity values decrease for all the lines tested, being the signal intensity drop more pronounced for those lines with the highest E_{sum} values (i.e., hard lines). A similar trend has already been reported in the literature by numerous authors [106-109]. The signal increase observed at flows from 0.6 L min^{-1} to 0.8 L min^{-1} could be explained mainly with the increase in the analyte transported to plasma that, according to the transport parameters evaluation (Figure III.22 b), increases with the nebulizing carrier gas flow. Nevertheless, a quantitative comparison shows that for nebulizing gas flows between 0.6 L min^{-1} and 0.7 L min^{-1} , the analytical signal increases more than the analyte transport rate. This might be due to an increase in the solvent loading rate (Figure III.22 b) that has been reported to improve the energy transfer efficiency in the plasma [106-108]. The increase in the emission intensity and the W_{tot} follow the same rate between 0.7 L min^{-1} and 0.8 L min^{-1} . Higher gas flow rates (more than 0.8 L min^{-1}) result in a shorter residence time due to an excessive velocity of the carrier gas, being the latter strongly dependent on the injector id (1.2 mm, in our experimental setup). Moreover, high gas flows can also lead to degradation of the plasma energetic characteristics, which affects to a greater extent the behavior of ionic lines.

In view of the results, 0.8 L min^{-1} (pressure of 1.06 bar) was chosen as the optimum nebulizing gas flow for the FFMN-spray chamber system studied.

III.3.3.3.2. *Sample liquid flow.*

The performance of the FFMN was studied in an interval of liquid sample uptakes between 0.04 mL min^{-1} (the minimum achievable with the peristaltic pump) and 0.6 mL min^{-1} . The nebulizing gas flow rate was fixed at 0.8 L min^{-1} for all the measurements. Drop size distributions of the primary aerosols are shown in Figure III.23 a. Increasing the liquid flow lead to the generation of coarser particles, since the same kinetic energy (provided by the nebulizing gas flow) is used for the nebulization of an increased liquid volume. On the other hand, the analyte and solvent transport rate values increase with the liquid uptake of the nebulizer (shown in Figure III.23 b), as a natural consequence of the increased aerosol quantity.

The results obtained with the ICP-OES for the different liquid flow conditions are shown in Figure III.23 c. Measurements were carried out in radial view mode at 13 mm observation height ALC (this observation height was the optimum for the majority of the lines studied and for all the Q_1 evaluated). The ICP-OES signals show the same trend for all the emission lines evaluated. Therefore, as in the case of nebulizing gas flow optimization, only a reduced set of emission lines is shown on Figure III.23 c for clearer visualization. Signal sensitivities increase when increasing Q_1 from 0.04 mL min^{-1} to 0.5 mL min^{-1} and then undergo a slightly decrease at 0.6 mL min^{-1} . The initial sensitivity increase can be explained by an increment of both, solvent loading (which increases the energy transfer efficiency) and analyte loading to the plasma. At higher sample uptakes, however, analyte loading is not significantly increased and the plasma ability to process an increase in solvent loading is lower [108,110]. Finally, 0.5 mL min^{-1} was chosen as an optimum total liquid sample uptake.

III.3.3.1. Analytical figures of merit of the FFMNS in ICP-OES and comparison with a conventional sample introduction system

The figures of merit obtained with the new FFMNS (i.e., multinebulizer connected to the 12 cm length single pass “on axis” spray chamber) are sensitivity, limits of detection (based on 3σ of the blank signal, 10 replicates), precision (as the relative standard deviation (RSD) of 5 replicates) and accuracy (based on the analysis of certified reference materials and expressed as percent of the result obtained with respect to the certified concentration). These are compared to the analytical figures of merit obtained with the commercial standard sample introduction system of the spectrometer (i.e., a Conikal nebulizer coupled to a cyclonic spray chamber).

Table III.4 shows the figures of merit obtained with the both systems. The measurements were done at the optimum conditions for both sample introduction systems ($Q_g = 0.8 \text{ L min}^{-1}$ and $Q_1 = 0.5 \text{ mL min}^{-1}$ for FFMNS, and $Q_g = 0.7 \text{ L min}^{-1}$ and $Q_1 = 1 \text{ mL min}^{-1}$ for the reference system) in radial and axial view modes. When radial view mode was used, an observation height above the load coil of 13 mm was chosen, being this position the optimum for both sample introduction systems.

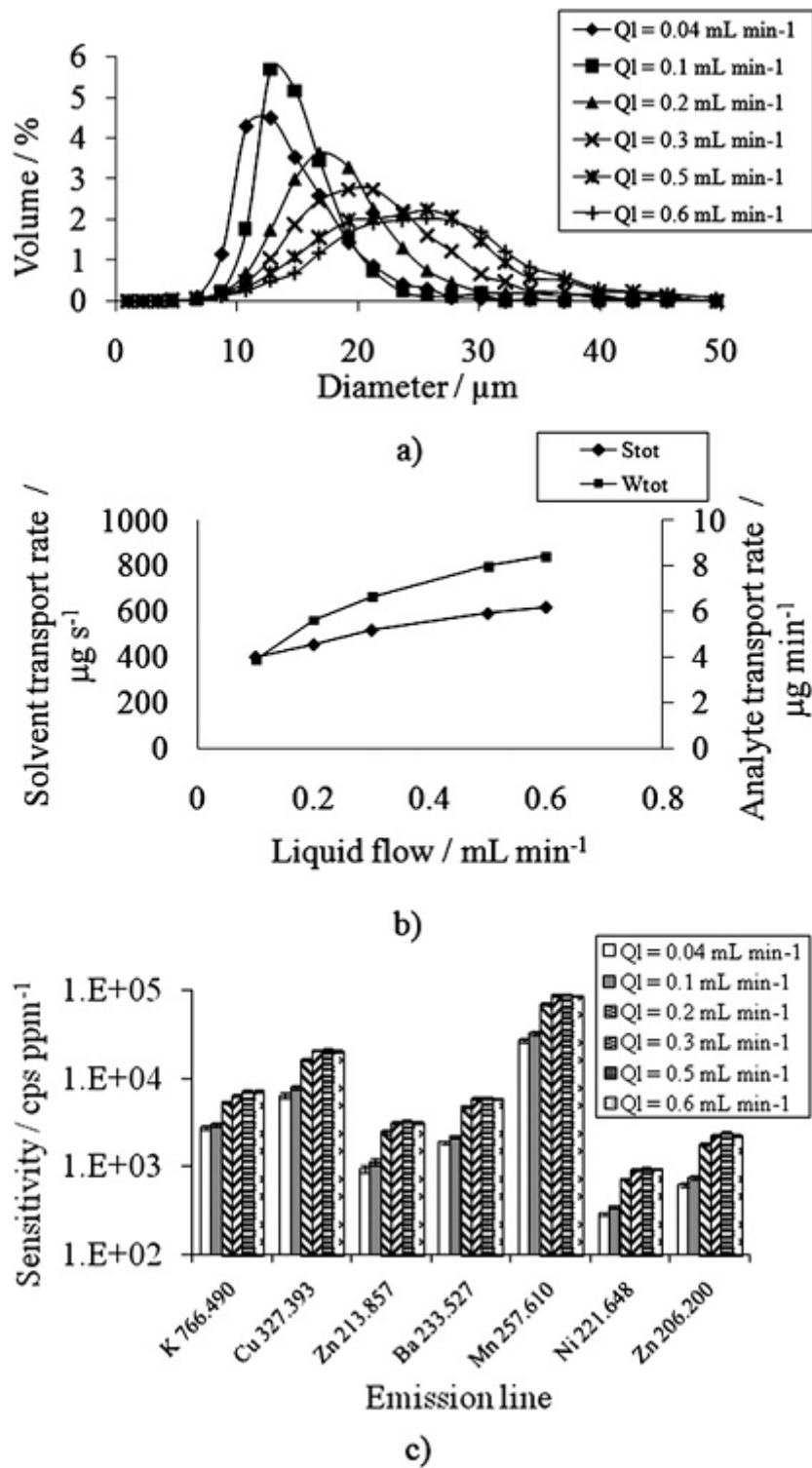


Figure III.23: Influence of the Q_l on: (a) drop size distributions of the aerosols generated with the FFMN (data for nozzle 1); (b) solvent and analyte transport rates; (c) ICP-OES sensitivity (“y” axis is in logarithmic scale for easier visualization). In all cases $Q_g: 0.8 \text{ L min}^{-1}$ (see text for explanation).

III.3.3.1.1. Sensitivity

Despite the optimum conditions for both sample introduction systems, a sensitivity comparison was done also under equal liquid sample uptake for both nebulizers (in this case the Conikal nebulizer was operated at a liquid flow rate of 0.5 mL min^{-1}). Comparative graphs of the results are presented in Figure III.24 for radial and axial view mode. Relative sensitivity in this Figure is defined as the ratio between the value of sensitivity obtained with the FFMNS and the value of sensitivity obtained with the reference sample introduction system (i.e., a relative sensitivity value of 1 means no difference between both sample introduction systems). When both nebulizers were fed at the same Q_l , the sensitivity of the FFMNS was slightly higher to that of the standard sample introduction system for all the emission lines evaluated (except Zn I (213.857 nm) and Cd II (228.802 nm) in axial view), providing a mean sensitivity increase of about 32% in radial view mode and 34% in axial view mode. The atomic potassium line (766.490 nm) was not included in the mean calculations in axial view mode, since it undergoes a sensitivity increase significantly above average. When the sample introduction systems were compared under their optimum operating conditions, signal sensitivities were found to be quite similar for both systems (data presented on Table III.4), although the sample uptake of the FFMN was, in this case, half of the Conikal nebulizer.

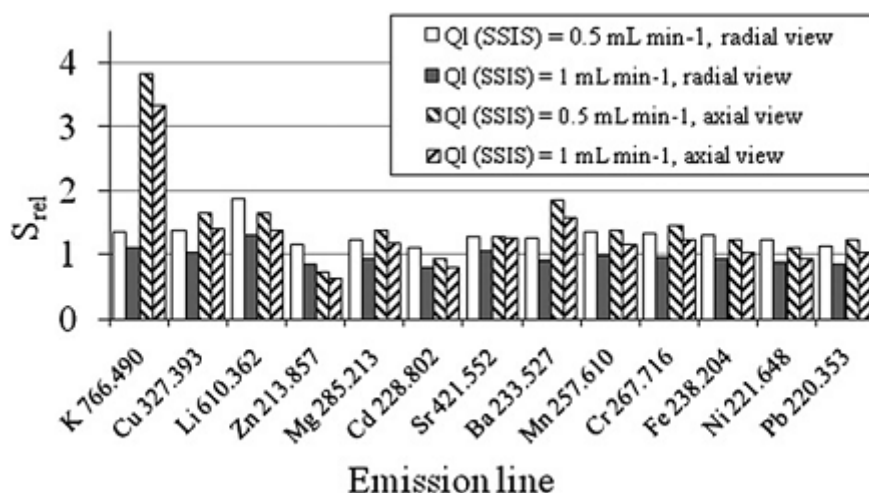


Figure III.24: Relative sensitivity ($S_{rel} = S_{FFMNS}/S_{SSIS}$) in both radial and axial view (see the legend). SSIS stands for standard sample introduction system. Working conditions: FFMN at $Q_g = 0.8 \text{ L min}^{-1}$, $Q_l = 0.5 \text{ mL min}^{-1}$; Conikal nebulizer at $Q_g = 0.7 \text{ L min}^{-1}$, Q_l , variable (see the legend).

Table III.4: Analytical figures of merit obtained with the FFMNS ($\dot{Q}_g = 0.8 \text{ L min}^{-1}$, $\dot{Q}_l = 0.5 \text{ mL min}^{-1}$) and the Conical nebulizer-cyclonic spray chamber ($\dot{Q}_g = 0.7 \text{ L min}^{-1}$, $\dot{Q}_l = 1 \text{ mL min}^{-1}$)

Emission line	FFMNS						Standard sample introduction system					
	Radial view			Axial view			Radial view			Axial view		
	S ¹	RSD ²	LOD ³	S ¹	RSD ²	LOD ³	S ¹	RSD ²	LOD ³	S ¹	RSD ²	LOD ³
K 766.490	2870	3.8	35	100 794	1.5	8	3139	4.6	32	32 112	3.2	23
Cu 327.393	11 313	3.4	5	99 694	2.7	2	10 910	4.5	3	73 304	1.7	8
Li 610.362	17 925	3.8	17	105 697	2.2	4	12 616	6.7	25	72 486	2.5	14
Zn 213.857	1887	2.8	22	24 896	2.6	5	21 89	3.8	19	21 171	2.2	3
Mg 285.213	21875	2.9	6	147 089	3.2	1	23 553	3.9	6	125 322	1.7	3
Cd 228.802	1418	2.1	43	15 388	2.8	7	1725	2.9	36	19 849	1.4	5
Sr 421.552	512 733	2.7	1	2 144 377	0.6	1	481 649	3.3	1	862 990	0.4	1
Ba 233.527	3476	2.6	8	33 009	2.9	3	3761	3.5	8	21 225	2.5	4
Mn 257.610	50 117	2.6	1	263 655	2.7	1	50 948	3.6	1	228 667	1.8	1
Cr 267.716	6553	2.4	11	32 870	3.0	8	6806	4.4	11	27 313	1.8	6
Fe 238.204	4499	2.5	7	32 520	2.8	4	4781	3.4	7	32 208	2.2	3
Ni 221.648	515	2.3	65	5638	3.4	13	599	3.3	56	6145	2.6	16
Pb 220.353	153	3.9	191	2001	4.9	69	176	5.8	166	1659	5.6	45

¹Sensitivity of the emission line / cps (mg L^{-1}),

²Relative standard deviation (%),

³Limit of detection / mg L^{-1}

III.3.3.1.2. Precision

In radial view mode, the precision of the FFMNS for all the lines evaluated is slightly better than the reference system with RSD values ranging 2.1% –3.9%, and 2.9% – 6.7% for FFMNS and standard sample introduction system, respectively. The mean RSD value for all the lines is of $2.9 \pm 0.6\%$ and $4.1 \pm 1.1\%$ for FFMNS and the standard sample introduction system, respectively. In axial view mode the precision of the sample introduction systems is much more similar, ranging from 0.6% to 4.9% for FFMNS and from 0.4% to 5.6% for the reference system, and with mean RSD values $2.7 \pm 1.0\%$ and $2.3 \pm 1.2\%$ for FFMNS and the standard sample introduction system, respectively. For both sample introduction systems, the Pb II emission line (220.353 nm) was the one showing the highest RSD value.

III.3.3.1.3. Limits of detection

In general, the limits of detection for both sample introduction systems are lower in axial view mode than in radial view mode. In axial view, the FFMNS presents slightly lower or equal limits of detection than the reference system for most of the emission lines evaluated, with exception of Zn I (213.857 nm), Cd II (228.802 nm), Cr II (267.716 nm), Fe II (238.204 nm), and PbII (220.353 nm). In radial mode, the LODs are slightly lower or equal for the standard sample introduction system than for the FFMNS for all the lines, with exception of Li I (610.362 nm). The lowest LOD for both sample introduction systems and in both viewing modes were found for Mn II (257.610 nm) and Sr II (421.552 nm) lines, being PbII (220.353 nm) the emission line having the worst LOD values.

III.3.3.1.4. Accuracy (analysis of certified reference material)

The certified reference materials (see the Reagents section) were analyzed using an external calibration and introducing the sample without dilution. The concentrations obtained using the FFMNS for the LGC 6010 (hard drinking water) are shown on Table III.5 together with the certified values and the results obtained with the reference system. The results obtained with the FFMNS match the certified concentration intervals for all the elements analyzed except Fe and Zn. Yet, it should be mentioned that the certified values for these two elements are obtained via isotope dilution ICP-

MS—a method far more precise than the one applied on this study. A comparison between the two sample introduction systems shows that the recoveries obtained with the FFMNS range between 87 and 106%, while with the Conikal nebulizer - standard spray chamber combination the obtained recoveries are between 79 and 102%.

Table III.5: Results of the analysis of LGC 6010 certified reference material (hard drinking water) using FFMNS ($Q_g = 0.8 \text{ L min}^{-1}$, $Q_l = 0.5 \text{ mL min}^{-1}$) and standard sample introduction system ($Q_g = 0.7 \text{ L min}^{-1}$, $Q_l = 1 \text{ mL min}^{-1}$).

Analyte	Concentrations ¹ obtained using FFMNS	Concentrations ¹ obtained using reference system	Certified concentrations ²
Ba	114 ± 1	105 ± 4	116 ± 4
Cr	44 ± 4	38 ± 5	48 ± 3
Fe	206 ± 3	208 ± 9	236 ± 6
Mn	51 ± 2	45 ± 9	48 ± 2
Ni	46 ± 8	38 ± 6	48 ± 4
Pb	86 ± 20	95 ± 8	95 ± 3
Zn	495 ± 1	551 ± 6	542 ± 16

¹in mg L^{-1} , ± standard deviation (5 replicates).

²in mg L^{-1} , ± confidence interval at 95%.

The matrix of the other standard reference material analyzed (LGC 6016, estuarine water) is much more complex than the one of the LGC 6010, with a total salt content of more than 5600 mg L^{-1} Na, K, P and Mg. In this case, the difference between the accuracy shown by the two systems is bigger - between 70 and 102% (mean of 84%) for the FFMNS and between 59 and 95% (mean of 72%) for the reference system.

This could probably be due to the fact that the matrix interference effects are strongly pronounced at the higher sample uptake of the Conikal nebulizer.

III.3.3.2. “In chamber” standard addition calibration

Finally, the possibility to use the new FFMNS for “in chamber” sample preparation was studied, applying it to an on-line standard addition calibration. The best performance was obtained using the following procedure: the sample was pumped through one of the nebulization nozzles (nozzle 2) while the blank or standard solutions were alternatively pumped through the other three (nozzles 1, 3 and 4). The sample uptake per nozzle was $0.125 \text{ mL min}^{-1}$ (total $Q_l = 0.5 \text{ mL min}^{-1}$), while Q_g was kept at 0.8 L min^{-1} . The calibration was performed with 5 standard solutions of concentration

range 0.2–1.0 mg L⁻¹. Axial view mode of the ICP-OES was used throughout for better sensitivity.

Usually, when standard addition is performed by aerosol mixing, a mathematical correction of the signals obtained for the sample and the standards is needed due to the difference in the sample introduction efficiency of the different aerosol sources.^{22,25} Thus, before the analysis, the following studies were performed: first, two independent external calibration graphs were obtained: (a) by introducing the standard solutions only through nozzle 2 (while the other three were nebulizing blank); and (b) by nebulizing the standard solutions simultaneously by nozzles 1, 3, and 4 (while blank was pumped through nozzle 2). After this, for each concentration, the *signal (b)/signal (a)* ratios were obtained. Each ratio (relative nebulization efficiency) was then multiplied by its corresponding concentration. The resulting corrected concentrations were used for the ‘x’ axis of the standard addition calibration graph. This procedure was applied to all the emission lines studied.

Figure III.25 presents a comparison in the accuracy of the analytical results obtained with FFMNS by external calibration and ‘‘in chamber’’ standard addition for a set of 5 atomic and ionic lines. A synthetic sample of 0.5 mg L⁻¹ of the analytes with 2500 mg L⁻¹ Na was used. As shown in the figure, using an external calibration leads to deviations between 16 and 21% for the lines Cd 228.802, Mn 257.610, Pb 220.353 and Ni 221.647, while the Cu 327.393 line is less affected by the matrix. On the other hand, the ‘‘in chamber’’ standard addition calibration successfully decreases the matrix effects being the relative error less than 2% for the lines Cd 228.802, Mn 257.610, Pb 220.353 and Ni 221.647, while the Cu 327.393 line is not affected. However, the precision intervals (in this case based on the confidence bands of the regression equation) are higher for the standard addition. Nevertheless, this is often considered an inherent characteristic of this calibration method [111].

The ‘‘in chamber’’ standard addition calibration was also applied to the analysis of a certified reference material. The LGC 6016, estuarine water, CRM was chosen for this study because of its high salt content (as already mentioned, around 5600 mg L⁻¹). The results are shown in Table III.6. As could be seen, the results obtained by the ‘‘in chamber’’ standard addition are closer to the certified values for Cd, Mn, and Ni than those obtained by the external calibration and similar for Cu (although here the precision interval obtained by the external calibration was smaller). The results obtained

for Pb with both calibration approaches are strongly deviated from the certified value, which could be probably due to the low signal sensitivity obtained for its emission line.

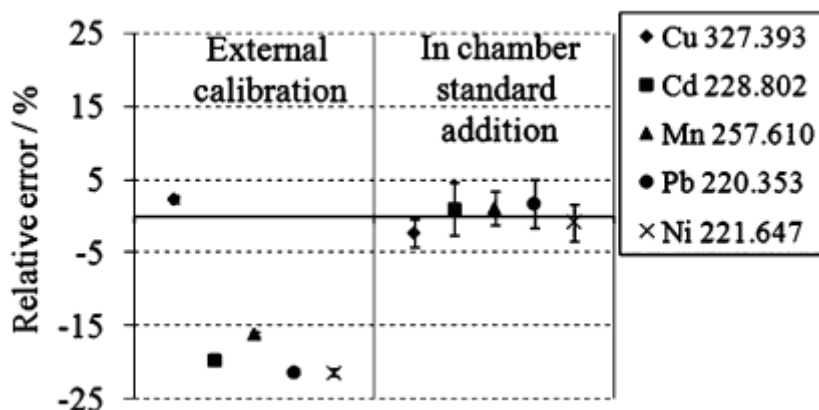


Figure III.25: Relative errors obtained with FFMNS in the analysis of a synthetic sample containing 0.5 mg L^{-1} of the analytes and 2500 mg L^{-1} Na by external calibration and “in chamber” standard addition.

Using only one nozzle to introduce the sample solution decreases the analytical signal with respect to the external calibration where the sample is introduced simultaneously through the four nozzles. This makes the use of “in chamber” standard addition calibration with FFMNS less applicable for trace analysis. However, for samples of no trace analyte concentration, the time saving due to the lack of previous sample preparation might favour the use of a FFMNS for analysis by “in chamber” standard addition, especially for high numbers of samples.

Table III.6: Results of the analysis of LGC 6016 certified reference material (estuarine water) using FFMNS by external calibration and “in chamber” standard addition calibration.

Analyte	Concentrations obtained with external calibration ¹	Concentrations obtained with standard addition ²	Certified concentrations ³
Cu	183 ± 4	181 ± 28	190 ± 4
Cd	73 ± 3	108 ± 14	101 ± 2
Mn	679 ± 26	971 ± 49	976 ± 31
Ni	134 ± 12	198 ± 11	186 ± 3
Pb	140 ± 11	268 ± 90	196 ± 3

¹ in mg L^{-1} , \pm standard deviation (5 replicates).

² in mg L^{-1} , \pm precision (confidence bands of the regression equation).

³ in mg L^{-1} , \pm confidence interval at 95%.

III.3.4. Conclusions

The Flow Focusing principle of nebulization has been successfully transferred to a multiple nozzle platform. Its high efficiency, even at low nebulizing gas uptakes, has surmounted some expected problems related to carrier gas flow incompatibilities with ICP sources due to the multinebulization effect. The FFMN prototype was successfully coupled to an ICP-OES spectrometer via a dedicated spray chamber with optimized geometry.

The results obtained with this first multinebulizer prototype are giving encouragement to the development of improved prototypes for future analytical applications, and development of new “in chamber” sample preparation procedures for ICP-based techniques.

However, in order to improve the analytical possibilities of the FFMNS, some drawbacks like the different individual nozzles performance observed in this first prototype, its relatively low transport efficiency and its big dimensions (that makes it incompatible with standard spray chambers) have to be overcome and further studies need to be carried out.

III.4. Referencias

- [1]. *Guide to inorganic analysis from the leaders in AA, ICP-OES and ICP-MS*, Perkin Elmer Inc., 2004.
- [2]. G.M. Hieftje, *The future of plasma spectrochemical instrumentation*, J. Anal. At. Spectrom., 1996, **11**, 613.
- [3]. F.M. Pennebaker, D.A. Jones, C.A. Gresham, R.H. Williams, R.E. Simon, M.F. Schappert y M.B. Denton, *Spectroscopic instrumentation in the 21st century: excitement at the horizon*, J. Anal. At. Spectrom., 1998, **13**, 821.
- [4]. J.M. Mermet, *Trends in instrumentation and data processing in ICP-AES*, J. Anal. At. Spectrom., 2002, **17**, 1065.
- [5]. D. Beauchemin, *Inductively coupled plasma mass spectrometry*, Anal. Chem., 2004, **76**, 3395.
- [6]. S.D. Tanner, V.I. Baranov y D.R. Bandura, *Reaction cells and collision cells for ICP-MS: A tutorial review*, Spectrochim. Acta, Part B, 2002, **57**, 1361.
- [7]. J.M. Mermet, *Is it still, necessary and beneficial to perform research in ICP-Atomic emission spectrometry?*, J. Anal. At. Spectrom., 2005, **20**, 11.
- [8]. R.F. Browner y A.W. Boorn, *Sample introduction: The Achilles' heel of atomic spectroscopy*, Anal. Chem., 1984, **56**, 786.
- [9]. C.B. Boss y K.J. Fredeen, *"ICP-OES Instrumentation"*, en *"Concepts, Instrumentation and Techniques in Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry"* (ed.), The Perkin Elmer Corporation, 1997, p. 3.
- [10]. http://web.nmsu.edu/~kburke/Instrumentation/NMSU_Optima2100.html, New Mexico State University, 2013.
- [11]. http://www.thermo.com/eThermo/CMA/PDFs/Articles/articlesFile__29099.pdf, Thermo Electron Corporation, 2013.
- [12]. X. Hou y B.T. Jones, *"Inductively coupled plasma optical emission spectrometry"*, en *"Encyclopedia of analytical chemistry – applications, theory and instrumentation"*, R.A. Meyers (ed.), John Wiley and Sons Ltd., 2000, vol. 11, p. 9468.
- [13]. T.J. Manning y W.R. Crow, *Inductively coupled plasma - atomic emission spectrometry*, Chem. Educ., 1997, **2**, 1.

- [14]. L. Ebdon, E.H. Evans, A. Fisher y S.J. Hill, "*Plasma atomic emission spectrometry*", en "*An Introduction to Analytical Atomic Spectrometry*", E.H. Evans (ed.), Jonh Wiley and Sons Ltd., 1998, p. 73.
- [15]. J.A. McLean, R.A. Huff y A. Montaser, *Fundamental Properies of Aerosols Produced in Helium by a Direct Injector Nebulizer*, Appl. Spectrosc., 1999, **53**, 1331.
- [16]. A.H. Lefebvre, "*General considerations*", en "*Atomization and Sprays*", S. Tamburrino y M. Prescott (ed.), Hemisphere Publishing Corporation, 1989, p. 105.
- [17]. J.L. Todolí, J. Mora, V. Hernandis y A. Canals, *Sistemas de introducción de muestras líquidas en espectrometría atómica*, Universidad de Alicante, 1996.
- [18]. J.L. Todolí, A. Canals y V. Hernandis, *Characterization of a new single-bore high-pressure pneumatic nebulizer for atomic spectroscopy: I. Drop size distribution, transport variables and analytical signal in flame atomic absorption spectrometry*, Spectrochim. Acta, Part B, 1993, **48**, 373.
- [19]. J.C. Ivaldi y W. Slavin, *Cross-flow nebulizers and testing procedures for inductively coupled plasma nebulizers*, J. Anal. At. Spectrom., 1990, **5**, 359.
- [20]. <http://www.icpnebulizers.com/index.html>, Precision Glassblowing Inc., 2013.
- [21]. R.S. Babington, *Method of atomizing liquid in a mono-dispersed spray*, US Patent 3. 421, 692, 1969.
- [22]. R.F. Suddendorf y K.W. Boyer, *Nebulizer for analysis of high salt content samples with inductively coupled plasma emission spectrometry*, Anal. Chem., 1978, **50**, 1769.
- [23]. <http://www.icpnebulizers.com/highsolids.html>, Precision Glassblowing Inc., 2013.
- [24]. B.L. Sharp, *Pneumatic nebulisers and spray chambers for inductively coupled plasma spectrometry. Part 2. Spray Chambers*, J. Anal. At. Spectrom., 1988, **3**, 939.
- [25]. L.R. Layman y F.E. Lichte, *Glass frit nebulizer for atomic spectrometry*, Anal. Chem., 1982, **54**, 638.
- [26]. S.C. Hight y J.I. Rader, *Use of the Hildebrand grid nebulizer for inductively coupled plasma atomic emission spectrometris analysis of foodware leach solutions and rodent soft tissues and femurs*, Analyst, 1991, **116**, 1013.
- [27]. J.A. Burgener, *Parallel path induction nebulizer*, U.S. Patent 5. 411, 208, 1995.

- [28]. J.L. Todolí y J.M. Mermet, *Sample introduction systems for the analysis of liquid microsamples by ICP-AES and ICP-MS*, Spectrochim. Acta, Part B, 2006, **61**, 239.
- [29]. K.L. Sutton, C. B'Hymer y J.A. Caruso, *Ultraviolet absorbance and inductively coupled plasma mass spectrometric detection for capillary electrophoresis-A comparison of detection modes and interface designs*, J. Anal. At. Spectrom., 1998, **13**, 885.
- [30]. J.L. Todolí, V. Hernandis, A. Canals y J.-M. Mermet, *Comparison of characteristics and limits of detection of pneumatic micronebulizers and a conventional nebulizer operating at low uptake rates in ICP-AES*, J. Anal. At. Spectrom., 1999, **14**, 1289.
- [31]. A. Canals, V. Hernandis y R.F. Browner, *Experimental evaluation of the Nukiyama-Tanasawa equation for pneumatic nebulizers used in plasma atomic emission spectrometry*, J. Anal. At. Spectrom., 1990, **5**, 61.
- [32]. B. Almagro, *Desarrollo de nebulizadores neumáticos basados en las tecnologías "Flow Focusing"[®] y "Flow Blurring"[®] para su uso en técnicas analíticas basadas en plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES e ICP-MS)* Departamento de química analítica, nutrición y bromatología, Universidad de Alicante, 2008.
- [33]. M. Cresser, *"Pneumatic nebulization"*, en *"Sample Introduction in Atomic Spectrometry"*, J. Sneddon (ed.), Elsevier Science Publisher B.V., 1990, p. 13.
- [34]. http://www.geicp.com/cgi-in/site/wrapper.pl?c1=Products_nebs_selectionguide, Glass Expansion Inc., 2013.
- [35]. <http://www.meinhard.com/index.cfm/category/1/nebulizers.cfm>, Meinhard Inc., 2013.
- [36]. <http://www.cetac.com/nebulizers/DS-5.asp>, CETAC Inc., 2013.
- [37]. A.M. Gañán-Calvo, *Stabilized capillary microjet and devices and methods for producing same*, U.S. Patent. 6,116,516, 402, 2000.
- [38]. E. Mendoza, *Diseño, desarrollo e implantación de un sistema de producción masiva de nebulizadores Flow Focusing para instrumentación analítica*, Proyecto final de carrera, Universidad de Sevilla, 2004.
- [39]. A.M. Gañán-Calvo, *Generation of steady liquid microthreads and micron-sized monodisperse sprays in gas stream*, Phys. Rev. Letters, 1998, **80**, 285.

- [40]. A.M. Gañán-Calvo, *Material didáctico Flow Focusing*, Universidad de Sevilla, 1998.
- [41]. L. Martín, M. Flores, P. Riesco, A. Rodríguez, A. Cebolla, S. Chávez y A.M. Gañán-Calvo, *Flow Focusing: a versatile technology to produce size-controlled and specific-morphology microparticles*, *Small*, 2005, **7**, 688.
- [42]. A.M. Gañán-Calvo, J.M. López y P. Riesco, *The combination of electrospray and flow focusing*, *J. Fluid Mech.*, 2006, **566**, 421.
- [43]. B. Almagro, A.M. Gañán-Calvo y A. Canals, *Preliminary characterization and fundamental properties of aerosols generated by a flow focusing pneumatic nebulizer*, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2004, **19**, 1340.
- [44]. B. Almagro, A.M. Gañán-Calvo, M. Hidalgo y A. Canals, *Flow focusing pneumatic nebulizer in comparison with several micronebulizers in inductively coupled plasma atomic emission spectrometry*, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2006, **21**, 770.
- [45]. H. Matusiewicz, M. Slachcinski, M. Hidalgo y A. Canals, *Evaluation of various nebulizers for use in microwave induced plasma optical emission spectrometry*, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2007, **22**, 1174.
- [46]. B. Almagro, A.M. Gañán-Calvo, M. Hidalgo y A. Canals, *Behaviour of a flow focusing pneumatic nebulizer with high total dissolved solids solution on radially- and axially-viewed inductively coupled plasma atomic emission spectrometry*, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2006, **21**, 1072.
- [47]. A.M. Gañán-Calvo, *Enhanced liquid atomization: From flow-focusing to flow-blurring*, *Appl. Phys. Lett.*, 2005, **86**, 214101.
- [48]. <http://oneneb.com>, Ingeniatic Tecnologías S.A., 2013.
- [49]. J. Moffett, G. Russell y J.P. Lener, *Evaluation of a novel nebulizer using an inductively coupled plasma optical emission spectrometer*, Agilent Inc. Application note, 2012.
- [50]. <http://www.chem.agilent.com/en-US/products-services/Parts-Supplies/Spectroscopy/ICP-OES/ICP-OES-Nebulizers-Accessories/Pages/OneNebVideo.aspx>, Agilent Technologies, 2013.
- [51]. T.D. Hettipathirana, *Determination of boron in high-temperature alloy steel using non-linear inter-element correction and microwave plasma-atomic emission spectrometry*, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2013, **28**, 1242.

- [52]. K.C. Ng y W. Shen, *Solution nebulization into a low-power argon microwave-induced plasma for atomic emission spectrometry: Study of synthetic ocean water*, Anal. Chem., 1986, **58**, 2084.
- [53]. K. Kahen, K. Jorabchi, C. Gray y A. Montaser, *Spatial mapping of droplet velocity and size for direct and indirect nebulization in plasma spectrometry*, Anal. Chem., 2004, **76**, 7194.
- [54]. D.D. Smith y R.F. Browner, *Measurement of aerosol transport efficiency in atomic spectrometry*, Anal. Chem., 1982, **54**, 533.
- [55]. R.F. Browner, A.W. Boorn y D.D. Smith, *Aerosol transport model for atomic spectrometry*, Anal. Chem., 1982, **54**, 1411.
- [56]. L.C. Bates y J.W. Olesik, *Effect of sample aerosol transport rate on inductively coupled plasma atomic emission and fluorescence*, J. Anal. At. Spectrom., 1990, **5**, 239.
- [57]. T.J. E. Björn, D. Goitom, *Noise characteristics and analytical precision of a direct injection high efficiency and micro concentric nebuliser for sample introduction in inductively coupled plasma mass spectrometry*, J. Anal. At. Spectrom., 2002, **17**, 1257.
- [58]. T.J. E. Björn, D. Goitom, *The origin of peristaltic pump interference noise harmonics in inductively coupled plasma mass spectrometry*, J. Anal. At. Spectrom., 2002, **17**, 1390.
- [59]. A. Canals, V. Hernandis y R.F. Browner, *Evolution of drop distributions for pneumatically generated aerosols in inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry*, Spectrochim. Acta, Part B, 1990, **45**, 591.
- [60]. J.W. Novak y R.F. Browner, *Characterization of droplet sprays produced by pneumatic nebulizers*, Anal. Chem., 1980, **52**, 792.
- [61]. H. Isoyama, T. Uchida, C. Iida y G. Nakagawa, *Small spray chamber with a concentric nebulizer for Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry*, J. Anal. At. Spectrom., 1990, **5**.
- [62]. J.L. Todolí y J.M. Mermet, *Influence of the spray chamber for vapor-based sample introduction at room temperature in ICP-AES*, J. Anal. At. Spectrom., 2002, **17**, 211.
- [63]. S. Maestre, J. Mora, J.L. Todolí y A. Canals, *Evaluation of several commercially available spray chambers for use in inductively coupled plasma atomic emission spectrometry*, J. Anal. At. Spectrom., 1999, **14**, 61.

- [64]. J.L. Todolí, S. Maestre, J. Mora, A. Canals y V. Hernandis, *Comparison of several spray chambers operating at very low liquid flow rates in inductively coupled plasma atomic emission spectrometry*, Fresenius J. Anal. Chem., 2000, **368**, 773.
- [65]. R.T. Gettar, P. Smichowski, R.N. Garavaglia, S. Farías y D.A. Batistoni, *Effect of nebulizer/spray chamber interfaces on simultaneous, axial view inductively coupled plasma optical emission spectrometry for the direct determination of As and Se species separated by ion exchange high-performance liquid chromatography*, Spectrochim. Acta, Part B, 2005, **60**, 567.
- [66]. P.A. Vieira, H. Zhizhuang, S. Chan y A. Montaser, *Evaluation of recycling cyclone spray chambers for ICP-AES*, Appl. Spectrosc., 1986, **40**, 1141.
- [67]. M. Wu y G.M. Hieftje, *A new spray chamber for inductively coupled plasma spectrometry*, Appl. Spectrosc., 1992, **46**, 1912.
- [68]. G.A. Zachariadis y C.E. Michos, *Development of slurry introduction method for multi-element analysis of antibiotics by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry using various types of spray chamber and nebulizer configurations*, J. Pharm. Biomed. Anal., 2007, **43**, 951.
- [69]. J.L. Todolí y J.M. Mermet, *Effect of the spray chamber design on steady and transient acid interferences in inductively coupled plasma atomic emission spectrometry*, J. Anal. At. Spectrom., 2000, **15**, 863.
- [70]. C. Dubuisson, E. Poussel, J.L. Todolí y J.M. Mermet, *Effect of sodium during the aerosol transport and filtering in inductively coupled plasma atomic emission spectrometry*, Spectrochim. Acta, Part B, 1998, **53**, 593.
- [71]. S. Maestre, J. Mora y J.L. Todolí, *Studies about the origin of the non-spectroscopic interferences caused by sodium and calcium in inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. Influence of the spray chamber design*, Spectrochim. Acta, Part B, 2002, **57**, 1753.
- [72]. G. Schaldach, I. Razilov y H. Berndt, *Optimization of the geometry of a double-path spray chamber for inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry by computer simulation and an evolutionary strategy*, Spectrochim. Acta, Part B, 2003, **58**, 1807.
- [73]. G. Schaldach, H. Berndt y B.L. Sharp, *An application of computational fluid dynamics (CFD) to the characterisation and optimisation of a cyclonic spray chamber for ICP-AES*, J. Anal. At. Spectrom., 2003, **18**, 742.

- [74]. G. Schaldach, L. Berger, I. Razilov y H. Berndt, *Characterization of a double-pass spray chamber for ICP spectrometry by computer simulation (CFD)*, Spectrochim. Acta, Part B, 2002, **57**, 1505.
- [75]. G. Schaldach, L. Berger, I. Razilov y H. Berndt, *Characterization of a cyclone spray chamber for ICP spectrometry by computer simulation*, J. Anal. At. Spectrom., 2002, **17**, 334.
- [76]. M. Huang, A. Hirabayashi, T. Shirasaki y H. Koizumi, *A Multimicrospray nebulizer for microwave-induced plasma mass spectrometry*, Anal. Chem., 2000, **72**, 2463.
- [77]. M. Bauer y J.A.C. Broekaert, *The use of dual-channel simultaneous pneumatic nebulization of two non-miscible solutions for the analysis of organic media using aqueous calibration solutions applied to elemental determinations in oils by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry*, J. Anal. At. Spectrom., 2008, **23**, 479.
- [78]. L.R. Gómez, G.D. Márquez y J.R. Chirinos, *Dual nebulizer sample introduction system for simultaneous determination of volatile elemental hydrides and other elements*, Anal. Bioanal. Chem., 2006, **386**, 188.
- [79]. D. Maldonado, J. Chirinos, Z. Benzo, C. Gómez y E. Marcano, *Analytical evaluation of a dual micronebulizer sample introduction system for inductively coupled plasma spectrometry*, J. Anal. At. Spectrom., 2006, **21**, 743.
- [80]. A. Asfaw y G. Wibetoe, *A new demountable hydrofluoric acid resistant triple mode sample introduction system for ICP-AES and ICP-MS*, J. Anal. At. Spectrom., 2007, **22**, 158.
- [81]. <http://www.marathonscientific.ca/MSIS.html>, Marathon Scientific, 2013.
- [82]. V. Huxter, J. Hamier y E.D. Salin, *Tandem calibration methodology: dual nebulizer sample introduction for ICP-MS*, J. Anal. At. Spectrom., 2003, **18**, 71.
- [83]. S.H. Nam, J.S. Lim y A. Montaser, *High-efficiency nebulizer for argon Inductively coupled plasma mass spectrometry*, J. Anal. At. Spectrom., 1994, **9**, 1357.
- [84]. H. Liu, R.H. Clifford, S.P. Dolan y A. Montaser, *Investigation of a high-efficiency nebulizer and thimble glass frit nebulizer for elemental analysis of biological materials by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry*, Spectrochim. Acta, Part B, 1996, **51**, 27.

- [85]. S.A. Pergantis, E.M. Heithmar y T.A. Hinnners, *Microscale flow injection and microbore high-performance liquid chromatography coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry via a high-efficiency nebulizer*, Anal. Chem., 1995, **67**, 4530.
- [86]. F. Vanhaecke, M.V. Holderbeke, L. Moens y R. Dams, *Evaluation of Commercially Available Microconcentric Nebulizer for Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*, J. Anal. At. Spectrom., 1996, **11**, 543.
- [87]. S.K. Luo y H. Berndt, *Sample introduction in ICP spectrometry by hydraulic high-pressure nebulization*, Spectrochim. Acta, Part B, 1994, **49**, 485.
- [88]. J.L. Todolí, J. Mora, J.M. Cano y A. Canals, *Organic sample introduction in inductively coupled plasma atomic emission spectrometry by hydraulic high-pressure nebulization*, Quím. Anal., 1997, **16**, 177.
- [89]. J.L. Todoli, M. Muñoz, M. Valiente, V. Hernandis y A. Canals, *Performance of the new single-bore high-pressure pneumatic nebulizer (SBHPPN) in plasma atomic emission spectrometry*, Appl. Spectrosc., 1994, **48**, 573.
- [90]. V. Hernandis, J.L. Todolí, A. Canals y J.V. Sala, *An experimental study of the behaviour of several elements in inductively coupled plasma mass spectrometry using the single-bore high-pressure pneumatic nebulizer*, Spectrochim. Acta, Part B, 1995, **50**, 985.
- [91]. J. Mora, J.L. Todolí, F.J. Sempere, A. Canals y V. Hernandis, *Determination of metals in lubricating oils by flame atomic absorption spectrometry using single-bore high-pressure pneumatic nebulizer*, Analyst, 2000, **125**, 2344.
- [92]. T.T. Hoahg, S.W. May y R.F. Browner, *Developments with the oscillating capillary nebulizer-effects of spray chamber design, droplet size and turbulence of analytical signals and analyte transport efficiency of selected biochemically important organoselenium compounds*, J. Anal. At. Spectrom., 2002, **17**, 1575.
- [93]. M. Huang, H. Kojima, A. Hirabayashi y H. Koizumi, *Sonic spray nebulizer for inductively coupled plasma atomic emission spectrometry*, Anal. Sci., 1999, **15**, 265.
- [94]. D.R. Wiederin, F.G. Smith y R.S. Houk, *Direct injection nebulization for Inductively coupled plasma mass spectrometry*, Anal. Chem., 1991, **63**, 219.
- [95]. M.J. Powell y D.W. Boomer, *Determination of chromium species in environmental samples using high-pressure liquid chromatography direct*

- injection nebulization and inductively coupled plasma mass spectrometry*, Anal. Chem., 1995, **67**, 2474.
- [96]. J.A. McLean, H. Zhang y A. Montaser, *A direct injection high-efficiency nebulizer for inductively coupled plasma mass spectrometry*, Anal. Chem., 1998, **70**, 1012.
- [97]. J.A. McLean, M.G. Minnich, L.A. Iacone, H. Liu y A. Montaser, *Nebulizer diagnostics: fundamental parameters, challenges, and techniques on the horizon*, J. Anal. At. Spectrom., 1998, **13**, 829.
- [98]. J. Hamier y E.D. Salin, *Tandem calibration methodology: dual nebulizer sample introduction for inductively coupled plasma atomic emission spectrometry*, J. Anal. At. Spectrom., 1998, **13**, 497.
- [99]. M. Bauer y J.A.C. Broekaert, *Investigations on the use of pneumatic cross-flow nebulizers with dual solution loading including the correction of matrix effects in elemental determinations by inductively coupled plasma optical emission spectrometry*, Spectrochim. Acta, Part B, 2007, **62**, 145.
- [100]. M. Krachler, N. Rausch, H. Feuerbacher y P. Klemens, *A new HF-resistant tandem spray chamber for improved determination of trace elements and Pb isotopes using inductively coupled plasma-mass spectrometry*, Spectrochim. Acta, Part B, 2005, **60**, 865.
- [101]. R.S. Olofsson, I. Rodushkin y M.D. Axelsson, *Performance characteristics of a tandem spray chamber arrangement in double focusing sector field ICP-MS*, J. Anal. At. Spectrom., 2000, **15**, 727.
- [102]. H. Liu y A. Montaser, *Phase-Doppler diagnostic studies of primary and tertiary aerosols produced by a high-efficiency nebulizer*, Anal. Chem., 1994, **66**, 3233.
- [103]. TSI, *Flow Sizer Software. Operations Manual*, 2005.
- [104]. S.J. Hill (ed.), *Inductively coupled plasma spectrometry and its applications*, Blackwell Publishing Ltd., 2007.
- [105]. J.W. Olesik y S.E. Hobbs, *Monodisperse dried microparticulate injector: a new tool for studying fundamental processes in inductively coupled plasmas*, Anal. Chem., 1994, **66**, 3371.
- [106]. M. Grotti, C. Lagomarsino y J.M. Mermet, *Effect of operating conditions on excitation temperature and electron number density in axially-viewed ICP-OES with introduction of vapors or aerosols*, J. Anal. At. Spectrom., 2006, **21**, 963.

- [107]. I.B. Brenner, A. Zander, M. Cole y A. Wiseman, *Comparison of axially and radially viewed inductively coupled plasmas for multi-element analysis: effect of sodium and calcium*, J. Anal. At. Spectrom., 1997, **12**, 897.
- [108]. I. Novotny, J.C. Farinas, W. Jia-Liang, E. Poussel y J.M. Mermet, *Effect of power and carrier gas flow rate on tolerance to water loading in inductively coupled plasma atomic emission spectrometry*, Spectrochim. Acta, Part B, 1996, **51**, 1517.
- [109]. P.W.J.M. Boumans, "*Pt. 1: methodology, instrumentation, and performance*", en "*Inductively coupled plasma emission, spectroscopy*"(ed.), Jonh Wiley and Sons Ltd., 1987.
- [110]. S.E. Hobbs y J.W. Olesik, *Inductively coupled plasma mass spectrometry signal fluctuations due to individual aerosol droplets and vaporizing particles*, Anal. Chem., 1992, **64**, 274.
- [111]. J.N. Miller y J.C. Miller, *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, Pearson Education Ltd., 2000.

IV. CAPÍTULO 3
CHIPS MICROFLUÍDICOS RÁPIDOS Y SELECTIVOS PARA LA
DETECCIÓN ELECTROQUÍMICA DE ANTIOXIDANTES EN
MUESTRAS COMPLEJAS

IV.1. Introducción

IV.1.1. Miniaturización en sistemas analíticos

El concepto de micro sistemas de análisis total (μ -TAS) fue introducido hace ya más que dos décadas por A. Manz y sus colaboradores [1]. El concepto μ -TAS surge como consecuencia natural del concepto previo de sistemas de análisis total (TAS), y consiste en la disminución del tamaño e integración de todas las operaciones analíticas (preparación, introducción, separación de la muestra y detección de los analitos de interés) en un único microdispositivo. En realidad el μ -TAS es un dispositivo que mejora las características del análisis aprovechando su tamaño reducido [2]. Por tanto, sus ventajas pueden ser resumidas en los siguientes aspectos: análisis más rápido, mejor transportabilidad, reducción del consumo de muestra y reactivos, así como la reducción de desechos, la automatización del análisis químico, alto rendimiento (posibilidad de procesar muestras en paralelo) y la posibilidad de llevar a cabo el análisis en modo *on line*. Como una extensión del concepto μ -TAS surgen los microsistemas denominados “lab-on-a-chip” para explicar el hecho de que en estos dispositivos no sólo se pueden llevar a cabo tareas puramente analíticas sino también otras funciones químicas, como por ejemplo la síntesis. Hoy, ambos términos se utilizan indistintamente [3].

El impacto de la tecnología “lab-on-a-chip” está hoy día fuera de toda duda [4-7]. Por tanto, se podría decir que este principio empieza a ser considerado como una potente herramienta analítica en muchos campos de aplicación [3]. La madurez de una tecnología se evalúa teniendo en cuenta su aplicabilidad en la vida real. En la última década han sido introducidos, en el mercado de la instrumentación analítica, algunos analizadores que incorporan dispositivos microfluídicos (microchips) [8,9]. Sin embargo, dichos instrumentos son todavía casos aislados. A pesar de la enorme popularidad de los sistemas miniaturizados en la literatura científica su aplicación a muestras reales es todavía limitada. Esta falta de aplicaciones reales se considera una debilidad de la tecnología [4,7,10,11] y apunta a la necesidad de realizar mayores esfuerzos tanto por parte de la comunidad científica como por parte de las grandes y pequeñas empresas productoras de instrumentación analítica en la dirección de acercar aún más el concepto “lab-on-a-chip” al análisis rutinario.

IV.1.2. Sistemas analíticos miniaturizados basados en flujo electroosmótico

Las técnicas de separación de los componentes de una muestra, aplicadas de forma más común en sistemas miniaturizados, son hoy día la cromatografía y la electroforesis. Entre ellas, la electroforesis capilar (CE) ha sido la base de las primeras aproximaciones hacia el μ -TAS mediante su aplicación a microescala en los microchips de electroforesis capilar (microchips de CE) [1].

CE es una técnica de separación muy potente cuyos fundamentos son bien conocidos y se encuentran perfectamente descritos [12-14]. En las bases de esta técnica se encuentran dos fenómenos electrocinéticos, la electroósmosis y la electroforesis, los cuales contribuyen al movimiento de los componentes de un fluido en un micro canal de material apropiado como consecuencia de la aplicación de un campo eléctrico en los dos extremos de dicho canal. La electroósmosis se describe como el movimiento de un líquido relativo a una superficie estacionaria cargada. En un micro canal la electroosmosis genera el denominado flujo electroosmótico (EOF) que es el responsable del movimiento no-selectivo de los electrolitos en el sistema electroforético (tanto la disolución portadora como la muestra). Por otro lado, el fenómeno denominado electroforesis consiste en el movimiento relativo de las especies cargadas dentro del volumen del fluido, según su relación masa/carga. Dicho movimiento relativo se conoce también como migración. Por tanto, en CE el fenómeno de la electroforesis es la base de la separación de los componentes de la muestra.

IV.1.2.1. Electroforesis capilar (CE) en microchip

El desarrollo de los microchips de CE ha sido favorecido, por un lado, por algunas características inherentes de los sistemas de electroforesis capilar, como son el uso de volúmenes de muestra ultra-pequeños (nanolitros) y, por otro lado, por la existencia de técnicas de microfabricación de estructuras de sílice perfeccionadas por la industria de los semiconductores. Las características más sobresalientes de los microchips de electroforesis capilar en comparación con los sistemas de CE convencionales se muestran en Tabla IV.1.

Tabla IV.1: Características relevantes de la electroforesis capilar convencional y los microchips de CE [3].

CE convencional		Microchips de CE	
Características analíticas	Características analíticas	Observaciones	Características técnicas
Alta eficiencia	Alta eficiencia	La posibilidad de aplicar altos campos eléctricos proporciona una alta eficiencia por unidad de longitud del canal de separación	Fabricación fácil de redes de micro canales con interconexiones de cero volumen muerto
Análisis rápido	Análisis ultra rápido	La alta capacidad de disipación de calor por el canal de separación del microchip permite aplicar altos campos eléctricos, lo que conlleva separaciones electroforéticas de gran velocidad	
Bajo consumo de muestra	Extremadamente bajo consumo de muestra	La disminución de tamaño reduce el consumo de muestras y reactivos y, en consecuencia, también se generan menos desechos	La química del vidrio y los polímeros (PDMS y PMMA, entre otros) es bien conocida
No portátil	Portátil	La miniaturización de CE conceptualmente mejora la portabilidad como consecuencia de la reducción del tamaño de la instrumentación	
No desechable	Desechable	Microchips de material polimérico de un solo uso podrían ser producidos a bajo coste por lo que serían desechables después de ser usados	Existencia de flujo electroosmótico (EOF) en vidrio y polímeros
Integración de separación y detección	Sistemas “multitasking”, lab-on-a-chip	La integración de componentes que realizan distintas funciones sobre un único chip permite la construcción de un laboratorio analítico miniaturizado	Facilidad en el uso de fenómenos electrocinéticos (sistemas libres de válvulas)
Alto rendimiento	Ultra alto rendimiento	Microchips que incorporan múltiples canales de separación en paralelo mejorarían el rendimiento de trabajo	

En la Figura IV.1 ([3]) se muestran los diseños típicos de unos microchips de CE que incorporan una red de canales con una anchura que varía típicamente entre 10 y 100 μm . Consisten en un inyector (de cruz sencilla (a), o de doble cruz (b)), un canal de separación (entre 3 y 10 cm de longitud), depósitos (reservorios) para la introducción de muestra (S), para el tampón de separación (RB) y para el desecho (W) El depósito SW se puede utilizar para la introducción de muestra, patrones o para los desechos, según la aplicación. El volumen de los depósitos normalmente tiene una capacidad entre 100-250 μL . En los depósitos se colocan electrodos que permiten la aplicación de campos eléctricos generados mediante una fuente de alto voltaje [3].

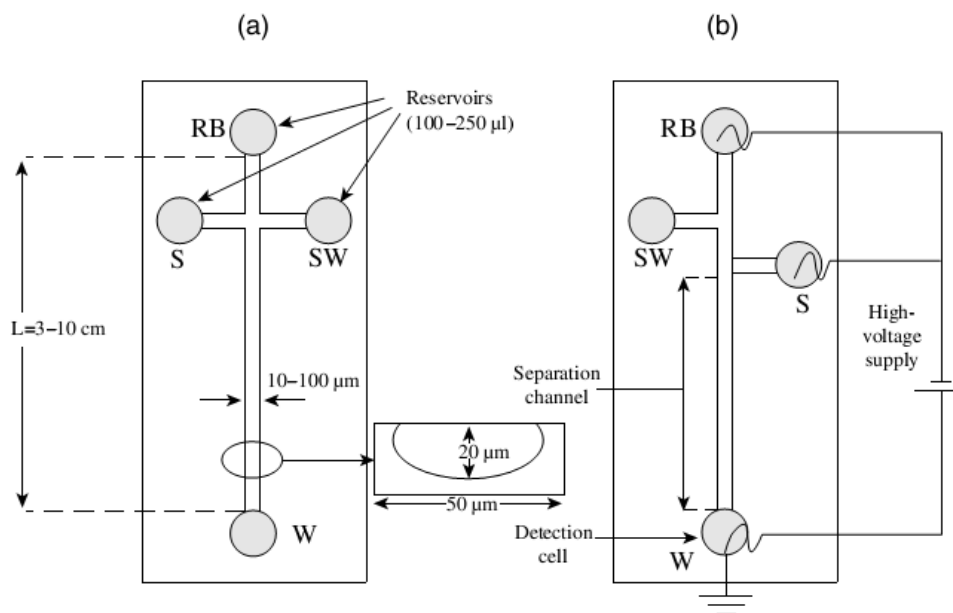


Figura IV.1: Esquemas de diseños comunes de microchips de CE: (a) Microchip con inyector T de muestra cruzado; (b) microchip con inyector T de muestra doble [3].

La capacidad de integración de las plataformas microfluídicos elimina la necesidad de tener conexiones fluidicas que interconectan los distintos componentes de un sistema convencional. Esto hace que los microchips se caractericen por una menor dispersión de la muestra, tiempos de retraso y volúmenes muertos entre los distintos componentes del sistema, lo que aumenta significativamente su poder de separación.

IV.1.2.2. Modalidades de CE en microchip

En la última década, el conocimiento adquirido sobre los sistemas convencionales de electroforesis capilar ha sido transferido a micro escala mediante la aplicación de las modalidades de separación electroforética en formato de microchip. A continuación se darán unos ejemplos representativos de las modalidades más comunes y se discutirán las tendencias actuales en su desarrollo.

La *electroforesis capilar en zona (CZE)* es la modalidad de separación electroforética más común gracias a su gran versatilidad y facilidad de operación. En Figura IV.2 ([15]) se muestra su principio de separación en el interior de un microchip. En esta modalidad, el canal de separación contiene solo una disolución portadora tampón en la cual es inyectada (hidrodinámicamente o electrocinéticamente) la muestra. En este caso, la separación de los

analitos se basa en las diferencias en su relación masa/carga. Sin embargo, la técnica CZE tiene la desventaja de tener su aplicabilidad limitada solo a separaciones de especies cargadas.

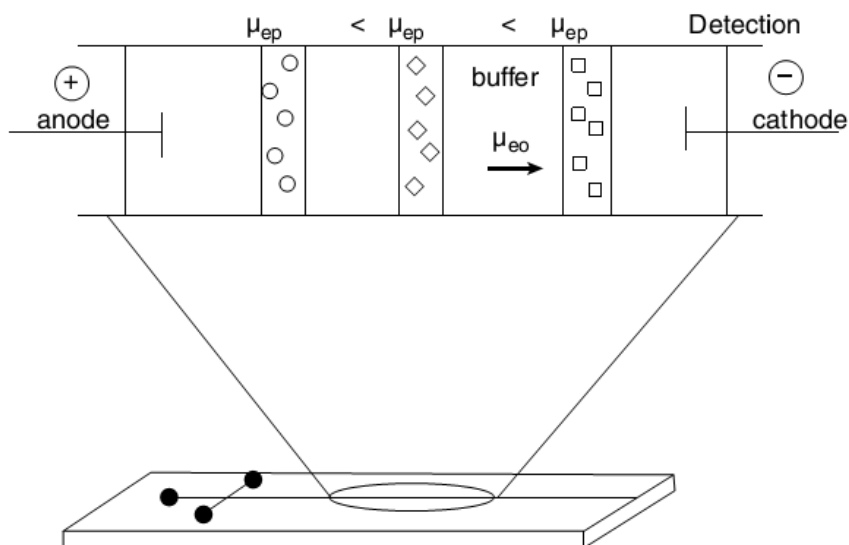


Figura IV.2: Principio de operación de CZE en un microchip: μ_{ep} – movilidad electroforética de los cationes (representados con los símbolos \circ , \diamond y \square) [15].

Otra limitación de la modalidad CZE en microchip es su relativamente baja capacidad de separación en comparación con la CE convencional, debido a la menor longitud del capilar de separación, por lo que sus aplicaciones más típicas han sido dedicadas a la separación de moléculas pequeñas [3]. Sin embargo, los últimos desarrollos tecnológicos en microfabricación han permitido producir microchips con canales de separación más largos, obteniendo con éstos eficiencias de separación excelentes (hasta 700 000 platos) [16].

En la *electroforesis capilar en gel (CGE)* (Figura IV.3, [3]) se usa un soporte que actúa como tamiz para aumentar la separación de los componentes de la muestra [13]. Para ello, el capilar de separación se llena con un gel de tamaño de poros controlado, basándose la separación en la distinta movilidad de las especies de la muestra dependiendo de su tamaño molecular (Figura IV.3(a)). Su campo de aplicaciones más destacado se encuentra en el análisis de ADN [10,13,17].

La modalidad electroforética denominada con *enfoque isoeléctrico capilar (IEF)* (Figura IV.3(b)) es una técnica de alta resolución para la separación y el análisis de moléculas anfóteras, como son las proteínas y los péptidos, en un gradiente de pH dentro del capilar de separación [13]. Una vez enfocados en el punto correspondiente a su punto isoeléctrico (pI)

los analitos pueden ser movilizados electroforéticamente o hidrodinámicamente para su detección a la salida del canal de separación [18]. Una posibilidad novedosa de detección en IEF se basa en técnicas de imagen dentro del canal de separación [19]. Ya que IEF es una técnica de enfoque y, por tanto, de preconcentración de los analitos, es especialmente apropiada para el análisis de muestras diluidas [20].

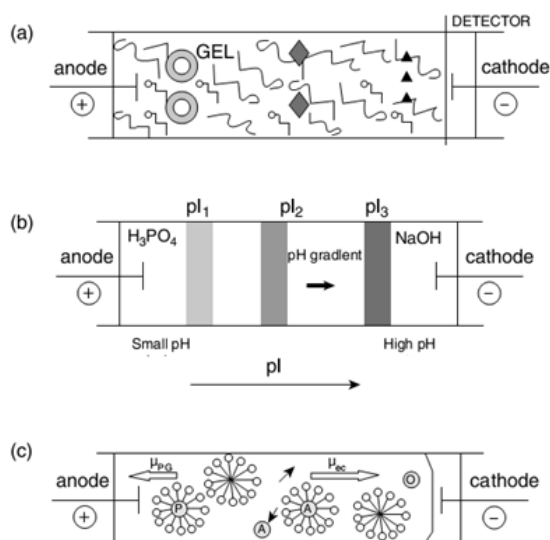


Figura IV.3: Principios de operación de distintas modalidades de CE en microchip: (a) electroforesis capilar en gel (CGE); (b) enfoque isoeléctrico capilar (CIEF), pI – punto isoeléctrico; (c) cromatografía electrocinética micelar (MEKC) [3].

La cromatografía electrocinética micelar (MEKC) (Figura IV.3 (c)) se caracteriza por el uso de micelas como fase pseudoestacionaria. Las micelas se forman añadiendo surfactantes a la disolución portadora tampón, a niveles por encima de su concentración micelar crítica. Las micelas formadas se mueven a velocidades distintas de la del EOF, lo que permite la separación de moléculas neutras debido a la distribución de éstas entre la fase acuosa tamponada y la fase orgánica (dentro de las micelas) [3,13,15]. Al igual que en el caso de CZE, la eficiencia de separación podría ser aumentada usando canales de separación más largos. Teniendo en cuenta las reducidas dimensiones de los microchips, dichos canales se han hecho en forma de serpentina [21] o en múltiples niveles (*multilayer*) [14].

Finalmente, la *electrocromatografía capilar (CEC)* combina algunas ventajas de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y la electroforesis capilar como son la alta eficiencia de la CE (debido al movimiento de los fluidos por fuerzas eléctricas) y la alta

selectividad de la HPLC (debido a las interacciones cromatográficas) [3]. La muestra se mueve a través del canal (pseudo columna) de separación empujada por el EOF mientras que la separación ocurre debido a la interacción de sus componentes con una fase estacionaria similar a las usadas en cromatografía líquida. Hoy día dichas fases estacionarias están basadas en sílice [22], nanotubos [23], nanoestructuras fabricadas dentro de la columna [24], monolitos poliméricos [25], entre otros.

IV.1.2.3. Materiales y técnicas de fabricación de microchips de CE

IV.1.2.3.1. Materiales

Los primeros microchips fueron construidos en sílice o vidrio debido a la capacidad de estos materiales para generar un fuerte y estable EOF [13]. Sin embargo, con los avances tecnológicos, nuevos materiales han sido utilizados. Actualmente, en la literatura científica hay información abundante sobre muchos materiales que permiten la fabricación de microchips. Los más usados en la actualidad pueden ser divididos en tres grupos generales:

- **Materiales inorgánicos:** junto a los tradicionalmente usados sílice y vidrio [26] se pueden incluir materiales cerámicos y vidriocerámicos [27,28] y materiales cerámicos modificados con compuestos orgánicos [29], entre otros;
- **Polímeros:** las ventajas de usar polímeros en lugar de materiales inorgánicos consisten en el menor coste de estos materiales combinado con su fácil producción a gran escala y su fácil adaptabilidad química, entre otros. En la actualidad existe una amplia gama de materiales poliméricos [13]. Según su estructura, éstos a su vez se pueden dividir en dos subgrupos: materiales elastómeros y materiales termoplásticos. Entre los elastómeros, el material más usado es el polidimetilsiloxano (PDMS) debido a su fácil producción y modificación. Entre los materiales termoplásticos [30] los más usados son el policarbonato [31,32], polimetilmetacrilato [30,33] varios polímeros acrílicos y fluoropolímeros, entre otros. [30];
- **Papel:** es un material emergente y prometedor en el campo de fabricación de microchips. Posee varias ventajas: bajo coste, gran disponibilidad, es fácilmente desechable, su superficie puede ser fácilmente modificada por impresión, posee estructura porosa, es biológicamente compatible, puede ser modificado químicamente,

proporciona un fondo de alto contraste para detecciones ópticas (debido a su color blanco), entre otros. [34,35].

También existen los denominados microchips híbridos construidos por varias capas de distintos materiales, lo que permite aprovechar las ventajas de combinar sus diferentes características [36].

En la Figura IV.4 ([13]) se muestran los materiales que han sido (o potencialmente podrían ser) usados en la fabricación de microchips de electroforesis capilar.

material	optical clarity	UV transparency	EOF ($\times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	separation	surface chemistry	surface charge
glass	good	>280 nm	3 (pH 7.0); 4.21 \pm 0.18 (pH 9.2)	yes	silanol	negative
silicon	opaque	none	a	a	silicon/silanol	requires oxidation
LTCC	opaque	none	3.00 \pm 0.05 (pH 7.0)	yes	aluminum oxide	negative
Ormocer	moderate	>300 nm	3.3 \pm 0.3 (pH 10.0, lithography); 5.3 \pm 0.1 (pH 10.0, UV-embossed)	yes	a	negative
PDMS (native)	good	>220 nm	2.5 \pm 0.5 (pH 6.0); 4.9 \pm 0.9 (pH 9.0)	yes	silanol	negative
PDMS (oxidized)	good	>220 nm	8.2 (pH 9.0)	yes	silanol	negative
TPE	moderate	>400 nm	2.2 (10 mM SDS); \sim 2.5 (pH 6.0); \sim 1.7 (pH 7.0); \sim 0.6 (pH 9.0); \sim 1.4 (pH 10.0); \sim 0.10 (pH 6–10, PEG-grafted); \sim 2.6 (oxidized)	yes	polyester	requires oxidation
PFPE	moderate	>350 nm	a	no	fluorocarbon	a
PS	good	>300 nm	1.54 \pm 0.03 (pH 9.2)	yes	phenyl	requires oxidation
PC	good	>360 nm	2.22 \pm 0.09 (pH 9.2)	yes	phenyl/carbonate	requires oxidation
PMMA	good	>340 nm	2.07 \pm 0.07 (pH 9.2)	yes	acrylate	negative
PEGDA	good	>300 nm	a	yes	acrylate/PEG	negative
PEGDA/PMMA	good	>300 nm	0.63 \pm 0.02 (pH 8.7)	yes	acrylate/PEG	negative
PDMS-co-PEO (5%)	moderate	>440 nm	2.5 \pm 0.7 (pH 6.0); 5.7 \pm 0.8 (pH 9.0)	yes	silanol/PEO	negative
PDMS-co-PEO (10%)	moderate	>440 nm	1.2 \pm 0.3 (pH 6.0); 2.5 \pm 0.3 (pH 9.0)	yes	silanol/PEO	negative
FEP/PEA	moderate	a	a	no	fluorocarbon	a
COC	good	>360 nm	3.08 \pm 0.28 (TBE buffer)	yes	cyclic olefin	requires oxidation
thiol-ene	moderate	a	a	no	thiol/allyl	a
PU (castor oil)	moderate	a	2.6 (pH 7.0)	yes	carbamate/ricinoleic acid	negative
PU (tecothane TT-1095A)	moderate	>300 nm	2.47 (pH 7.0)	yes	carbamate/phenyl	negative
zein	moderate	a	a	no	zein	a
SU-8	moderate	>360 nm	a	yes	epoxy/phenyl	negative
paper	opaque	none	a	a	cellulose	a

^aInformation that was not reported in the literature.

Figura IV.4: Propiedades de los materiales usados en la fabricación de microchips de CE [13].

IV.1.2.3.2. Técnicas de fabricación

Fabricación de microchips de vidrio

Normalmente las estructuras se generan sobre obleas de vidrio utilizando tecnologías fotolitográficas estándar [3,37,38]. En la Figura IV.5 ([3]) se presenta un ejemplo de este procedimiento. Sobre la oblea se deposita una capa *sacrificial* (Cr/Al) (Figura IV.5 *deposition*). A continuación, sobre ésta se deposita el material polimérico fotosensible, el que

se hace soluble (desarrollo positivo) o insoluble (desarrollo negativo) en disoluciones reveladoras después de la exposición a la luz (Figura IV.5: *exposition light*). En el siguiente paso, el material fotosensible es expuesto a la luz en la región definida por una fotomáscara, normalmente usando un alineador.

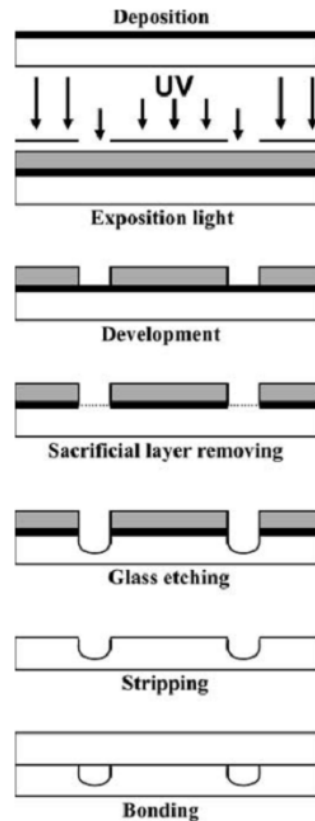


Figura IV.5: Fabricación de microchips de vidrio mediante fotolitografía [3].

La fotomáscara es una placa con un molde diseñado que es transparente mientras el fondo es opaco (o viceversa) a la exposición de la luz. Después de que el microchip es tratado para endurecer el material fotosensible no expuesto a la luz, el material fotosensible expuesto es disuelto con una disolución reveladora (Figura IV.5: *development*). La capa de máscara *sacrificial* (Cr/Al) de la región expuesta es retirada usando productos apropiados (Figura IV.5: *sacrificial layer removing*), permaneciendo intacta la capa *sacrificial* situada debajo del material fotosensible no expuesto a la luz. Después del desarrollo de los microcircuitos en el material fotosensible, éstos se han de transferir al sustrato mediante técnicas de grabado (Figura IV.5: *glass etching*). El principal reactivo utilizado para el grabado es HF, el cual puede ser preparado en varias disoluciones que incluyen HF/NH₄F, HF/HNO₃HF/NH₄F,

HF/HNO₃, y HF concentrado. La velocidad de grabado del vidrio con HF es fácilmente controlable si se controla la temperatura. Después del grabado de los microcanales se retira la capa del material fotosensible y de máscara *sacrificial* (Figura IV. 5: *stripping*), y se perforan los depósitos de entrada (no mostrado en la Figura IV.5). Los depósitos de entrada pueden ser perforados sobre el sustrato grabado o sobre otra oblea de vidrio. Cuando los depósitos son perforados sobre obleas grabadas es mucho más fácil alinear los sustratos para enlazarlos. Por último, el sustrato que contiene los microcanales se sella con otra pieza de sustrato para formar el microchip (Figura IV.5: *bonding*) [38,39];

Fabricación de microchips de polímeros

Los dos modos principales de fabricar microchips de polímeros son por replicado de un molde (métodos de moldeo) y por fabricación directa [30,38,40].

- La formación de microcanales y otras estructuras utilizando métodos de moldeo generalmente implica dos pasos fundamentales: (i) fabricación del molde (también conocido como maestro), y (ii) transferencia de los canales diseñados desde el molde a los sustratos poliméricos, que constituyen el microchip, mediante grabación en caliente, inyección o fundición. Estos métodos tienen en común que una forma muy blanda o incluso líquida del polímero es vertida a un molde, después el material es endurecido y retirado del molde [40];
- Por otra parte, los métodos directos de fabricación consisten en la eliminación de las pequeñas cantidades de polímero en los sitios donde las microestructuras (microcanales, depósitos) deberían ser localizadas. Este tipo de microfabricación se lleva a cabo mediante ablación con láser [3,39,40].

Información más detallada sobre las técnicas de fabricación de microchips se puede encontrar en varios excelentes libros [38,41].

IV.1.2.4. Métodos de detección en microchips de CE

La detección es uno de los aspectos críticos en la electroforesis capilar en microchip debido sobre todo a los pequeños volúmenes de muestra, la presencia de un fuerte campo eléctrico o las pequeñas dimensiones físicas del microchip y/o sus canales [42]. Por tanto, el desarrollo de nuevas estrategias de detección es un campo de gran actualidad investigadora.

Una visión más amplia, y a la vez más profunda sobre estas investigaciones se puede encontrar en varias revisiones recientes [42-45]. Actualmente, los dos modos de detección más comunes son la *detección óptica* y la *detección electroquímica*. Otras técnicas aplicadas son la *detección por conductivimétrica sin contacto, acoplada capacitivamente (C^AD)* [46], la *espectrometría de masas* (con muchas contribuciones publicadas y unas revisiones detalladas [47-49]), *espectrometría atómica basada en plasma de acoplamiento inductivo en sus modalidades óptica y de masas (ICP-OES e ICP-MS)* [44] y la *resonancia magnética nuclear* [50], entre otras.

IV.1.2.4.1. *Detección óptica*

Esta modalidad de detección ha sido la más usada, sobre todo en la región espectral UV-Vis. Sus ventajas son la versatilidad, rapidez y una gran variedad de soluciones comerciales para la construcción de distintos dispositivos de detección [42]. Un método de detección muy relevante es la *fluorescencia inducida por láser* debido a sus extraordinarios límites de detección y su gran intervalo dinámico [51]. En este sentido una de las tendencias actuales en investigación y desarrollo está dedicada al uso de nuevas fuentes de excitación para reemplazar los láseres tradicionalmente usados. Esto es debido a los altos precios de los láseres actuales así el limitado número de longitudes de onda disponibles. Para tal fin han sido utilizadas *lámparas de xenon* [52] y *LEDs* [53]. Los LEDs son especialmente interesantes para el diseño de dispositivos portátiles por sus pequeñas dimensiones y bajo coste.

IV.1.2.4.2. *Detección electroquímica (ECD)*

La detección electroquímica en microchips de CE surge como una alternativa a los métodos ópticos tradicionalmente usados los cuales presentan algunas desventajas entre las que se encuentran el alto coste de la instrumentación, una portabilidad reducida y una frecuente necesidad de derivatización de los analitos, entre otras. Con los métodos electroquímicos de detección la sensibilidad analítica no se ve comprometida por la miniaturización, la instrumentación es relativamente simple (en comparación con los detectores ópticos) y los electrodos se pueden fabricar con materiales diferentes para aumentar la sensibilidad y la selectividad [54]. Sin embargo, surge la necesidad de eliminar

los efectos de la presencia del campo eléctrico de separación sobre la detección. Para tal fin, han sido propuestos tres diseños experimentales (Figura IV.6, [55]):

- Alineación del electrodo de trabajo justo a la salida del canal de separación (detección *end-channel*, Figura IV.6(1a) y (1b)): En esta configuración, el voltaje de separación tiene una influencia mínima sobre el potencial aplicado en el detector electroquímico porque la mayor parte del este voltaje cae a través del canal de separación [55,56]. Aun así, esta influencia mínima puede causar un cambio significativo en el potencial del electrodo de trabajo. Por lo tanto, para determinar el potencial de detección apropiado para un analito dado es necesario obtener un voltamperograma hidrodinámico para el compuesto de interés en las mismas condiciones de separación que serán empleadas con las muestras. Las principales ventajas de este diseño son que no es necesario utilizar ningún desacoplador y que el microsistema es sencillo y robusto. La desventaja principal de este diseño consiste en la pérdida de eficacia de separación debido a la distancia existente entre el final del canal de separación y el electrodo de trabajo. Esta distancia de separación es también crítica en el desacoplamiento, influyendo en el ruido de la señal analítica obtenida [10,11,56-58];

- Colocación del electrodo de trabajo directamente dentro del canal de separación (detección *in-channel*, Figura IV.6(2)). En esta modalidad los analitos llegan al electrodo en el interior del canal de separación, eliminando el ensanchamiento de banda que a menudo se observa con alineaciones tipo *end-channel*. La configuración *in-channel* ayuda a eliminar algunas de las características negativas encontradas con la configuración tipo *end-channel*, especialmente con respecto al alineamiento del electrodo de trabajo al final del canal de separación así como con respecto a las eficacias de separación. Sin embargo, requiere el uso de un potencióstato bien aislado [55,59];

- Colocación del electrodo de trabajo fuera del canal de separación (detección *off-channel*, Figura VI.6(3)): En este modo de detección la disposición del electrodo es similar a la de la detección *in-channel* el potencial aplicado al detector es aislado del voltaje de separación utilizando un desacoplador que desvía el voltaje de separación a tierra. De este modo se crea una región libre de campo después del electrodo

desacoplador, en la cual los analitos son empujados unicamente por el flujo electrosmótico generado antes del desacoplador [55,60].

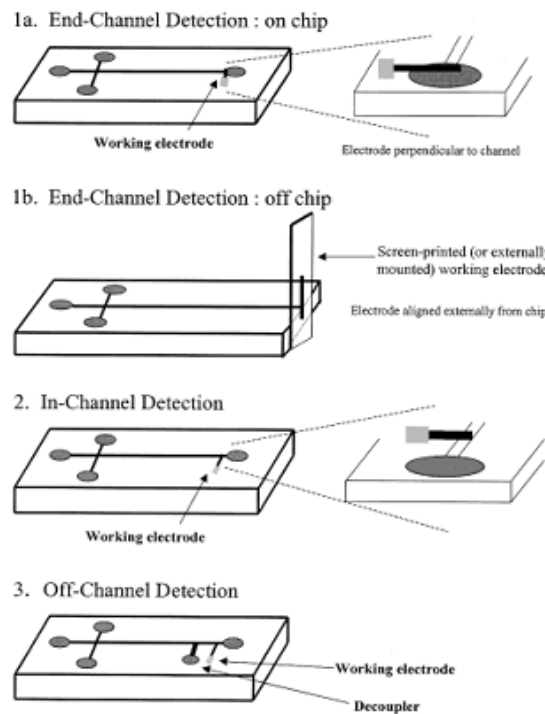


Figura IV.6: Diseños experimentales de posicionamiento del electrodo de trabajo para facilitar el aislamiento del detector electroquímico del voltaje de separación: 1 (a y b) “end-channel”; 2 “in-channel”; 3 “off-channel” [55].

El funcionamiento del detector y el éxito del microsistema CE-ECD están fuertemente influenciados por el material del electrodo de trabajo, ya que es dónde tiene lugar la reacción electroquímica del analito. La selección del electrodo de trabajo depende sobre todo del comportamiento redox de los analitos y de la corriente de fondo en la región del potencial aplicado. Tradicionalmente se han utilizado como material para el electrodo de trabajo carbono, platino y oro [61]. Más recientemente se han publicado aplicaciones de *electrodos impresos* (“*screen printed electrodes*”) de grafito cuya superficie está activada mediante nanotubos de carbono [62].

IV.2. Objetivo y plan de trabajo

IV.2.1. Objetivo

El objetivo del trabajo de investigación presentado a continuación consiste en combinar y mejorar las estrategias existentes para la determinación de antioxidantes en muestras reales mediante el uso de plataformas microfluídicas de electroforesis capilar con detección electroquímica integrada. Con la plataforma microfluídica propuesta se pretende desarrollar en un único método de análisis las determinaciones tanto de índices electroquímicos específicos de los distintos grupos de antioxidantes naturales (flavonoides y ácidos fenólicos) así como de cada antioxidante individualmente.

IV.2.2. Plan de trabajo

Para conseguir el objetivo marcado anteriormente se ha previsto el siguiente plan de trabajo:

- Estudio del efecto del pH de la disolución portadora sobre la capacidad separadora de la plataforma microfluídica, con el fin de establecer los valores óptimos correspondientes a las estrategias desarrolladas (determinación de índices electroquímicos e individual);
- Optimización de las variables experimentales de la separación electroforética (tiempo y potencial de separación y de inyección de los analitos);
- Optimización de las variables experimentales que influyen en la detección electroquímica (potencial de detección) y caracterización del rendimiento analítico del sistema (obtención de las características analíticas);
- Aplicación del método desarrollado al análisis de antioxidantes naturales en alimentos.

IV.3. Resultados experimentales: Fast and selective microfluidic chips for electrochemical antioxidant sensing in complex samples

IV.3.1. Introduction

The impact of “lab-on-a-chip” technology is nowadays unquestioned, although its degree has been a topic of some excellent discussions [4-7]. Another recently published deliberation rationalizes microfluidics’ current state situating it on the “slope of enlightenment” [63]. According to these insights, the microfluidic chips represent one of the most revealing examples on how the miniaturization could offer us new analytical possibilities. Indeed, microfluidics allows us to analyze samples in a very short time, using extremely low sample and reagent volumes and generating inconsiderable residues, it presents high capacity for multiplexing analysis integration and, depending on the fabrication material applied, it might be disposable.

Nevertheless, the maturity of a certain technology is normally judged by its real-life application. In this sense, despite the enormous popularity of the microsystems in the scientific literature, their real-life sample application extent has been quite limited so far. In this sense, some technology weaknesses have been pointed out and discussed [4,7,10,11]. Other reviews also tackle these aspects indicating technological weaknesses and recommending action frames from multidisciplinary philosophical [64], technological [65], or analytical [66] points of view.

In our opinion, the time has come for the microfluidic technology to make the pass from the “proof-of-concept” to the “fitness-to-purpose” or “real-life-applications” and for this reason in this work we chose complex samples with current social and economical impact. In this direction, antioxidants are well recognized for their anticancer and antiaging properties and their determination is of high interest for different industries like the food industry, agriculture, pharmaceuticals, and cosmetics. Ever since the well-known French paradox discovery, antioxidants have attracted scientific and public attention and they have been the subject of extensive research. Among them, particular interest has been paid to the group of natural antioxidants, introduced to our vital cycle nutritionally (with antioxidant-rich or enriched food) or by applying special cosmetic formulas. The natural antioxidants consist of

(poly)phenolic compounds, with flavonoids and phenolic acids being predominant [67,68].

Traditionally there are two general strategies of antioxidant determination. The first is a total index determination by spectrophotometric detection (Folin-Ciocalteu method), but it is characterized by high interference levels and has been reported to overestimate the phenolic contents [69-72]. The second one consists of a separation of the individual antioxidant species and their consecutive detection. High-performance liquid chromatography (HPLC) or conventional capillary electrophoresis (CE) techniques are usually used, which require long separation times (additionally HPLC consumes high quantities of toxic organic reagents).

Microfluidic chips could be a natural alternative to all of them, since they can serve as a microflow-injection system for index determination and, when used for CE, present good separation capability. In addition, the microfluidic techniques offer short analysis time and the perspective to perform in situ multiplexing analyses, which together indicate a possible future commercialization. Microfluidic chips elegantly offer more creative and strategic possibilities of governing the selectivity at a convenient extent and integrating different methodologies, combined at the same time with their already mentioned inherent benefits. On the other hand, the electrochemical detection (ED) adds yet another value to the miniaturized analytical system, which could be summarized in three aspects: (i) the analytical response is directly related to the antioxidants' biological activity; (ii) since all the antioxidants are electroactive, the samples could be measured directly (without previous derivatization); and (iii) the ability to monitor antioxidants with different activity due to the additional selectivity provided by an adequate modification of the working potential.

Taking into account the discussion above, the subject of this study has been to reveal the analytical potential of the capillary electrophoresis microchips with electrochemical detection (as a particular case of microfluidic chips) in the complicated problematic of the real-life sample analyses, as a step toward the "plateau of productivity" for this technology [63]. To this end, varying the media's pH on the same microchip platform and depending on the antioxidants' acid-base properties, two new analytical approaches denominated class-selective electrochemical index determination (CSEID) and individual antioxidant determination (IAD) have been introduced and applied to a set of important complex samples. The two approaches combine the traditional methods' analytical characteristics (total index

determination and individual separation). Furthermore, new analytical simplification strategies have been proposed, aiming to integrate the philosophy of the two new approaches as well as a simplified calibration method on a single microchip. The “total and individual” determination integration concept using simple model mixtures has already been proposed [58,73], but here it is enhanced for real sample analysis.

The excellent quality of the results obtained manifests the analytical potential of microfluidic technology as a new tool in this complex analytical field, adding a valuable contribution to the studies already reported in the literature [74-80].

IV.3.2. Experimental

IV.3.2.1. Reagents and standards

(+)-Catechin, rutin, quercetin, chlorogenic acid, ferulic acid, caffeic acid, protocatechuic acid, vanillic acid, and gallic acid were purchased from Sigma-Aldrich Co. (Munich, Germany). Apples and pears, red and white wines, and green tea tablets were acquired at different local markets (Madrid, Spain). All chemicals used in buffer preparation and in supporting electrolytes were of reagent grade. Phosphate, borate and MES buffers were prepared as 100 mM aqueous solutions and these were further diluted to the desired ionic strength. The pH values of the buffer solutions were monitored with a pH meter. MES buffer was prepared by appropriate dilution of 2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid (Sigma-Aldrich, Munich, Germany) and its pH was adjusted to a value of 5 with 1M sodium hydroxide. Phosphate buffer with a pH value of 7 was prepared by an appropriate dilution of 200 mM aqueous solutions of dibasic sodium phosphate and monobasic sodium phosphate. Borate buffer with a pH value of 9 was prepared by an appropriate dilution of 200 mM aqueous solutions of sodium tetraborate (borax) and boric acid. Methanol was purchased from Scharlab S. L. (Barcelona, Spain). In all cases, ultrapure water, obtained by a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA), was used.

IV.3.2.2. Apparatus

The CE-ED microsystem used has been previously reported [74]. A scheme of the microfluidic device and its dedicated amperometric detection cell used in this work is

presented on Figure IV.7. The glass chip was fabricated by Micralyne (Model MC-BF4-001, Edmonton, Canada) using wet chemical etching and thermal bonding techniques. The microchip consisted of a glass plate with dimensions 88 mm x 16 mm (4) with a four-way injection simple cross, a 74 mm long separation channel (5), and side arms measuring 5 mm in length. The dimensions of the channels were 20 mm depth and 50 mm width. The original waste reservoir was cut off, leaving the channel outlet at the end side of the chip, thus facilitating end-channel amperometric detection. The glass chip was fixed over a plexiglas holder, which contained reservoirs for the buffer (2) and sample (3) solutions. Pipette tips were inserted into each of the three holes on the glass chip for solution contact between the channel and the corresponding reservoir in the chip holder. A platinum wire was inserted into each reservoir, which served as a contact for the high-voltage power supply (1). The amperometric detector (end-channel detection) consisted of a detection cell (6), an Ag/AgCl wire as a pseudo-reference electrode (10), a platinum wire as a counter electrode (9), and a glassy carbon disc (2 mm ϕ) as a working electrode (8). The latter was further held in place by a plastic screw pressing the electrode against the channel outlet. A removable spacer (adhesive tape, 60 mm) was introduced between the working electrode surface and the outlet of the channel to control the distance between the electrode and the channel separation with reproducibility. The spacer was suitably cut and pasted in order to keep the working electrode surface free. The simple combination of spacer and screw allowed carrying out electrode alignment with reproducibility. Optical control of the alignment was also checked with the aid of a magnifying glass. Amperometric detection was performed using an Autolab PGSTAT 12 potentiostat and GPES v4.9 software from Eco Chemie (Utrecht, The Netherlands). The high-voltage power supply from Glassman High Voltage Inc. (High Bridge, NJ, USA) had an adjustable voltage range between 0 and 5000 V.

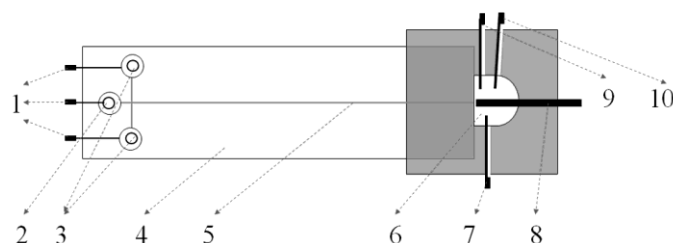


Figure IV.7: Cross channel microfluidic device with amperometric detection used in this work; 1 – CE anode electrodes, 2 – running buffer reservoir, 3 – sample reservoirs, 4 – microchip body, 5 – separation channel, 6 – amperometric determination cell reservoir, 7 – CE ground electrode, 8 – working electrode (glassy carbon), 9 – counter electrode, 10 – pseudo-reference electrode.

IV.3.2.3. Procedures

IV.3.2.3.1. Standards

All stock standard solutions were dissolved in methanol and stored in nontransparent vessels at -20° C. Working solutions for the studies were then appropriately diluted in electrophoresis buffer. All working solutions were well protected from light and used immediately after preparation.

IV.3.2.3.2. Sample preparation

Apples and pears were peeled to separate the peels from the pulps. A total of 5 g of each were extracted with 10 mL of methanol for 1 h, later centrifuged for 10 min and stored in nontransparent vessels at -20° C. Before analysis, the extracts were diluted in electrophoresis buffer 1:5 v/v. Red and white wines were diluted before analysis in buffer 1:10 v/v and 1:5 v/v, respectively. Green tea tablets were triturated; 400 mg were extracted with 10 mL of methanol for 1 h, later centrifuged for 10 min and stored in nontransparent vessels at -20° C. Before analysis, the extracts were diluted in electrophoresis buffer 1:25 v/v (1:50 v/v for the integrated calibration experiment).

IV.3.2.3.3. Electrophoretic Procedure and Amperometric Detection

The protocols applied are similar to previously published ones [74]:

- *Electrode preparation.* The oxidation of the polyphenolic compounds leads to their deposition over the electrode surface known as electrode fouling. To avoid the consequences of this, before each session, the working electrode was cleaned using three kinds of treatment: physical, chemical, and electrochemical. The physical treatment involved manual polishing of the electrode with alumina powder (diameters, 1 and 0.05 μm) for 3 min and then rinsing it with water. During the chemical treatment, the electrode was subsequently sonicated in ethanol and water for 15 s each. The electrochemical treatment consisted of subjecting the electrode to cyclic voltammetry at a scan rate of 10 V s⁻¹ for 15 min. The electrode state was checked using a 10⁻⁴ M Fe(CN)₆⁴⁻ solution. On the other hand, electrode fouling was not found to be an obstacle

during a session of 3-6 sample injections, with RSD intervals 1.5-8.9% for model solutions (with analyte concentrations of 30 μM for all the analytes except protocatechuic acids, for which is 400 μM) and 1.2-12.7% for samples (where some of the analyte concentrations are very low), respectively;

- *Electrophoretic procedure.* The channels of the glass microchip were treated before use and between groups of runs by rinsing with 0.1 M NaOH and deionised water for 15 minutes each. This procedure was carefully monitored to obtain reproducible results. Before analysis, the running buffer and the sample reservoirs were filled with the appropriate solutions. A voltage of +2.0 kV was applied for 5 minutes to the running buffer reservoir in order to fill the separation channel. The same voltage was again applied for 20 seconds to the sample reservoir in order to fill the injection channel, while the detection reservoir was grounded and the others were floating. The voltage was then applied for 5 minutes to the running buffer reservoir in order to remove the remaining samples previously introduced from the separation channel;

- *Amperometric detection.* The detection reservoir was filled with 1 M HNO_3 solution and detection potential of +1.0 V was applied to the working electrode. All experiments were performed at room temperature;

- *Spectrophotometric determination (Folin-Ciocalteu method).* A mixture of 0.5 mL of each sample or spectrophotometric standard, 0.5 mL of Folin–Ciocalteu reagent and 10 mL of Na_2CO_3 1M were introduced in a volumetric flask and diluted with water to 25 mL. After letting them react for 1 h, the solutions were measured at 750 nm. The spectrophotometer used was a Perkin Elmer model $\lambda 35$ (Perkin-Elmer Inc., Waltham, Massachusetts, USA).

IV.3.2.4. Safety considerations

The high-voltage supply should be handled with extreme care in order to avoid electrical shock.

IV.3.3. Results and discussion

IV.3.3.1. Analytical Strategy Proposal

With the existing analytical demands addressed, two different approaches were developed, transferring the traditional analytical methods' philosophy on a microscale. The first one, denominated class-selective electro-chemical index determination (CSEID), consisted of developing a strategy allowing fast measurements of total indexes of antioxidant structure families in order to relate the chemical structures presented in the sample with its antioxidant activity. Such indexes are important measurants due to the possible synergic effect provoked by the variety of structures in the sample. To the authors' knowledge, this is the first time such a strategy is proposed, improving the traditional one since it offers class-selective indexes for the antioxidant classes in a very short time.

The second approach, denominated individual antioxidant determination, had for a goal the fast determination of the individual antioxidant composition of the sample.

To describe this study in practical terms, first the pH of the sample and the running buffer had to be strategically established so that all the flavonoids would remain neutral while the phenolic acids would become single ionized according to their pKa values (≥ 4.6 for the phenolic acids and ≥ 6.7 for the flavonoids studied; data shown in Table IV.2). As a consequence, at this first class-selective buffer pH, all the flavonoids would comigrate while all the phenolic acids would comigrate subsequently. Second, a more individually selective running buffer pH had to be chosen, permitting the separation of the individual phenolic compounds according to their q/m ratio. A mixture of nine representative natural polyphenolic compounds were studied using buffer solutions with pH values of 5, 7, and 9 obtained with 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid (MES), phosphate, and borate buffers, respectively. The results obtained at each pH are also shown in Figure IV.8.

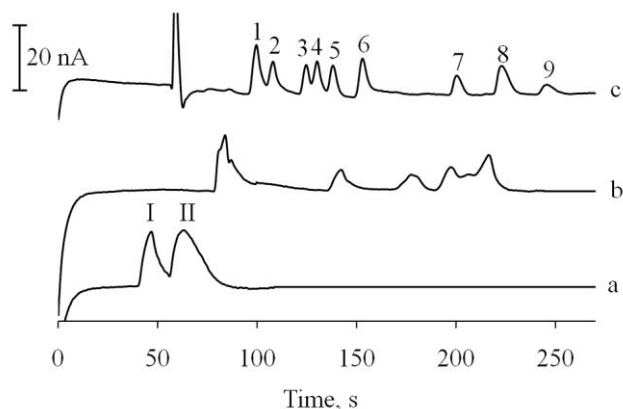


Figure IV.8: Electropherograms of the analyte mixture obtained at different conditions: a: pH = 5 (MES buffer, 10 mM), class-selective electrochemical index determination (CSEID) (I - total flavonoids peak, II - total phenolic acids peak); b: pH = 7 (phosphate buffer, 10 mM) - unresolved electropherogram; c: pH = 9 (borate buffer, 10 mM), individual antioxidant determination (IAD) (1 – (+)-catechin, 2 – rutin, 3 – ferulic acid, 4 – chlorogenic acid, 5 – vanillic acid, 6 – quercetin, 7 – caffeic acid, 8 – gallic acid, 9 – protocatechuic acid).

Table IV.2: Analytes studied in this work with their structure, molecular weight and pKa [81-83].

Analyte type	Flavonoids					
Analyte name	(+)-Catechin		Rutin		Quercetin	
Structure						
Molecular weight, g mol ⁻¹	290.27		610.52		338.27	
pKas	8.7 9.7		7.1 9.2		6.7 9.0	
Analyte type	Polyphenolic acids					
	Hydroxycinnamic acids			Hydroxybenzoic acids		
Analyte name	Chlorogenic	Ferulic	Caffeic	Protocatechuic	Ferulic	Caffeic
Structure						
Molecular weight, g mol ⁻¹	354.31	194.18	180.16	154.12	168.15	170.12
pKas	3.4 No data found	4.6 8.7	4.6 8.4	4.4 8.9	4.4 9.4	4.5 8.7

Figure IV.9 shows the optimal results that correspond to the two analytical approaches strategically proposed: antioxidant classes separation (Figure IV.9A) of total flavonoids (peak I) and total phenolic acids (peak II) in less than 100 s, using MES at pH = 5, and individual separation of nine phenolic compounds in borate buffer at pH = 9 in only 260 s (Figure IV.9B). Next, selected results obtained by each of these approaches will be critically discussed.

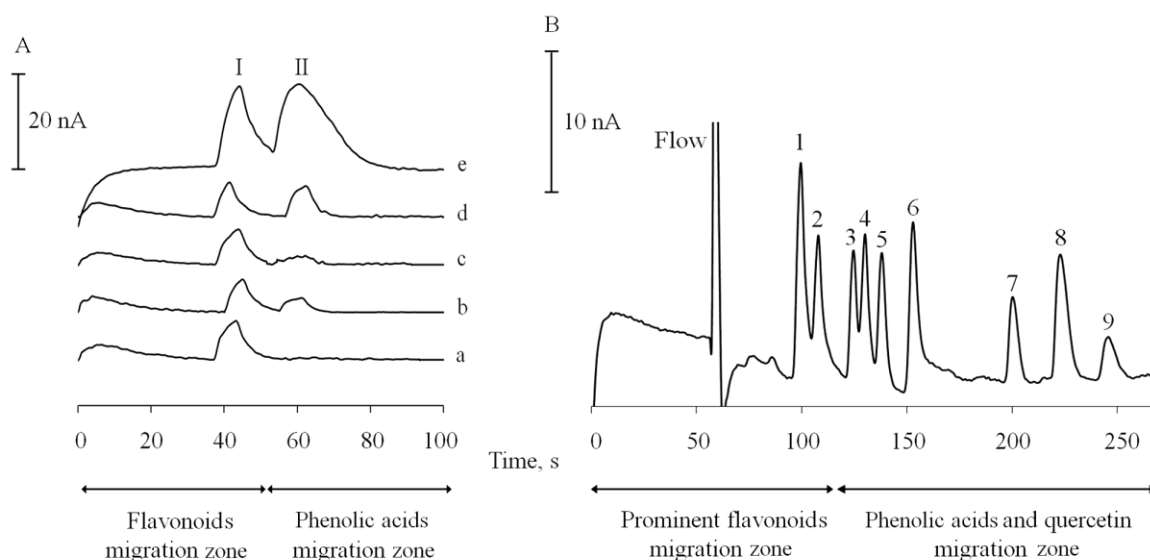


Figure IV.9: Analytical approaches visualization. (A) class-selective electrochemical index determination (MES, pH = 5, 10 mM); (I) total flavonoids peak, (II) total phenolic acids peak (analyte concentration of the different compounds in all cases: 50 μ M each). Mixtures' composition (a) (+)-catechin, (b) (+)-catechin + gallic acid; (c) (+)-catechin + rutin + ferulic acid, (d) (+)-catechin + ferulic acid + gallic acid; (e) all nine analytes (Table IV.2). (B) Individual antioxidant determination (borate, pH = 9, 10 mM); (1) (+)-catechin 80 μ M, (2) rutin 80 μ M, (3) ferulic acid 80 μ M, (4) chlorogenic acid 80 μ M, (5) vanillic acid 80 μ M, (6) quercetin 80 μ M, (7) caffeic acid 200 μ M, (8) gallic acid 80 μ M, and (9) protocatechuic acid 200 μ M. In all cases, $t_{injection} = 3s$, $V_{separation} = 2 kV$, and $E = +1 V$.

IV.3.3.2. Class-selective electrochemical index determination of natural antioxidants

In order to demonstrate the concept's viability, different standard mixtures of flavonoids and phenolic acids were carefully examined. Figure IV.9A shows their corresponding electropherograms. It might be observed that two well-defined peaks corresponding to the flavonoids (peak I) and to the phenolic (hydroxybenzoic and hydroxycinnamic) acids (peak II) were obtained, independently from the sample composition. The migration times, the peak

half-widths, the peak heights, and resolution for each standard mixture are listed in Table IV.3. The excellent migration time concordance obtained confirms the hypothesis that the individual flavonoids and phenolic acids do indeed comigrate, while their family peaks are well resolved ($R_s \geq 1.1$). On the other hand, the peak half-width obtained for the phenolic acids has results that are higher than the one for the flavonoids, which might be attributed to the fact that the comigrating phenolic acids have wider charge/mass (q/m) ratio due to the difference in their acid-base properties.

Table IV.3: Class-selective electrochemical index determination approach parameters¹.

Analyte composition	Peak number ²	t_m , s ³	$\omega_{1/2}$, s ⁴	Height, nA ⁵	R_s ⁶
(+)-Catechin	I	43 ± 1	4.9 ± 0.8	6.9 ± 0.2	---
(+)-Catechin	I	43 ± 1	5.9 ± 0.6	7.0 ± 0.4	1.7
Gallic acid	II	65 ± 2	7.2 ± 0.3	4.8 ± 0.6	
(+)-Catechin + rutin	I	44 ± 1	6.0 ± 1.0	9.6 ± 0.1	1.3
Ferulic acid	II	65 ± 1	7.2 ± 0.5	3.1 ± 0.2	
(+)-Catechin	I	44 ± 1	7.1 ± 0.7	7.4 ± 0.1	1.9
Ferulic + gallic acids	II	64 ± 1	7.8 ± 0.2	6.9 ± 0.3	
(+)-Catechin + rutin + quercetin	I	47 ± 1	5.9 ± 0.3	16.5 ± 0.2	
Chlorogenic + caffeic + ferulic + gallic + vanillic + protocatechuic acids	II	63 ± 2	9.4 ± 0.5	17.7 ± 0.3	1.1

¹Expressed as mean values ± standard deviation (n=3).

²Peak I: total flavonoids. Peak II: Total phenolic acids.

³Migration time.

⁴Peak half width.

⁵Peak height.

⁶Resolution.

To obtain the best conditions, injection and separation potentials were carefully optimized (Figure IV.10). The best electrokinetic conditions for injection were 3 kV for 3 seconds while separation potential was established at 2 kV, because it resulted in best resolution at a shortest analysis time. It should be also mentioned here, that in this case the separation potential was optimized in order that the total phenolic acids peak would not split having in mind that the acid structures (and molecular weights) were notably different, taking into account that the phenolic acids presented in the model solutions belong to two different sub-families (i.e. hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acids). These results revealed valuable information on

how to sieve and classify the total flavonoids and total phenolic acids sample composition in less than 80 seconds.

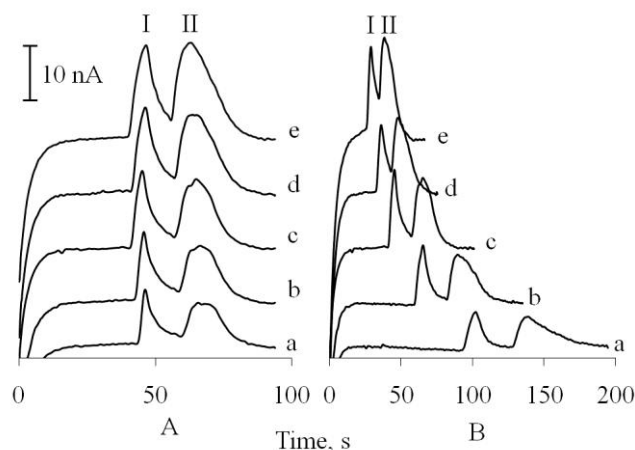


Figure IV.10: CSEID approach separation conditions optimization; A: effect of injection voltage ($V_{separation}$: 2000 V), B: effect of separation voltages ($V_{injection}$: 3000 V): a) 1000 V, b) 1500 V, c) 2000 V, d) 2500 V, e) 3000 V; sample of: I: (+)-catechin (50 μ M) and II: gallic acid (200 μ M).

The detection potential was also optimized following the analytes' hydrodynamic curves at optimal electrokinetic separation conditions (Figure IV.11). The most adequate, in terms of signal-to-noise ratio and baseline stabilization time, detection potential was found to be +1.0 V (data not shown).

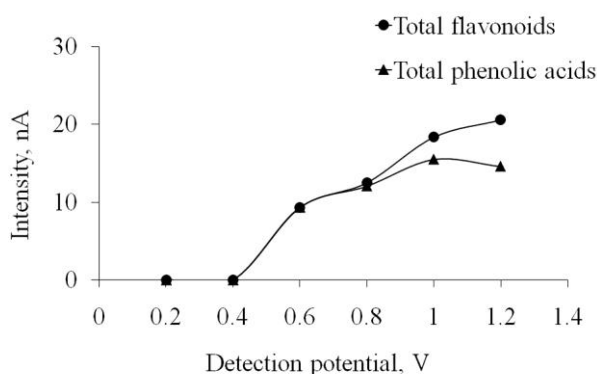


Figure IV.11: CSEID approach detection potential optimization. Hydrodynamic ammograms for total flavonoids and total phenolic acids. $V_{separation} = 2$ kV, $V_{injection} = 3$ kV, $t_{injection} = 3$ s. (+)-Catechin (50 μ M) and gallic acid (200 μ M) were used as model analytes for the flavonoids and the phenolic acids, respectively.

The analytical behavior of the method was determined by applying the external calibration procedure and studying its corresponding regression curves. The analytical figures of merit obtained are provided in Table IV.4. These figures reveal good EOF stability (between 2.1 and 3.2% RSD), and the excellent linear regression ($R^2 > 0.99$). The instrumental detection limits (LOD) and quantification limits (LOQ) were adequate for the determination of the CSEI in complex samples. It should be mentioned here that the EOF showed no interferences in the flavonoids elution behavior and the calibration procedure.

Table IV.4: Analytical figures of merit for CSEID approach.

Peaks	t_m^1 , s	RSD ² %	$R_{1,2}$	Calibration ³			LOD ⁴ , μM	LOQ ⁵ μM	Precision ⁶ RSD %
				Slope ³ nA μM^{-1}	Intercept ³ nA	R^2			
I. Total flavonoids	47 ± 1	2.1	1.07	0.31 ± 0.03	- 1 ± 1	0.99 1	4.2	14.0	2.3
II. Total phenolic acids	63 ± 2	3.2		0.14 ± 0.03	1.0 ± 0.5	0.99 1	7.6	25.4	4.3

¹ Migration time ± standard deviation, $n = 3$.

² EOF precision, $n=3$.

³ Regression equation $Y = a + bX$ where y is the amperometric current (nA) and X is concentration (μM). Slope and intercepts are expressed with confidence intervals ($\alpha = 0.05$). External calibration, 5 points, (\pm)-catechin and chlorogenic acid were used to represent the total flavonoids and the total phenolic acids, respectively.

⁴ Limit of detection; based on 3σ of the lowest calibration standard (10 μM).

⁵ Limit of quantification; based on 10σ of the lowest calibration standard (10 μM).

⁶ RSD% of 5 replicates of calibration standard with concentration of 30 μM .

Regarding the samples analyses, Figure IV.12A (electropherograms a₁-g₁) shows the corresponding electropherograms of a representative sample set including fruit skins and pulps, red and white wines, and green tea. The most important observation was that in all cases only the peak corresponding to the total flavonoids (peak I) was detected, indicating the fact that this family of natural antioxidants is present in the foods studied at a higher extent. The identification was done by migration time comparison of the natural samples with a sample spiked with a certain analyte quantity and by the recovery studies as may be seen in Figure IV.12A (electropherograms a₂-g₂). As expected, the results revealed that the fruit skin extracts showed higher analytical signals than the fruit pulp ones, and the same tendency was observed for the red wine with respect to the white wine. Also, the highest signals were observed for the green tea extract, which was also expected for this type of sample. The recovery studies results used in order to evaluate the accuracy of this analytical approach are summarized in Table IV.5.

The results reveal good recovery values (between 90.7% and 108%), that are independent from the chemical structure and the extract applied, indicating very good approach accuracy.

Table IV.5: CSEID approach accuracy evaluation¹.

Sample	C _{sample} ²	Added analyte, μM	C _{doped sample} ²	Recovery, %
Apple skin	14.9 \pm 0.2	15	29.4 \pm 0.1	96.7
Apple pulp	8.7 \pm 0.4	15	22.3 \pm 0.5	90.7
Pear skin	10.2 \pm 0.5	15	24.9 \pm 0.5	98.0
Pear pulp	< LOD	5	5.4 \pm 0.1	108.0
Red wine	21.56 \pm 0.06	15	37.2 \pm 0.1	104.2
White wine	12.22 \pm 0.03	15	27.26 \pm 0.07	100.3
Green tea	40.1 \pm 0.8	20	58.5 \pm 0.9	92.0

¹(\pm)-catechin equivalent.

² in $\mu\text{M} \pm$ confidence intervals ($n = 3$, $\alpha = 0.05$).

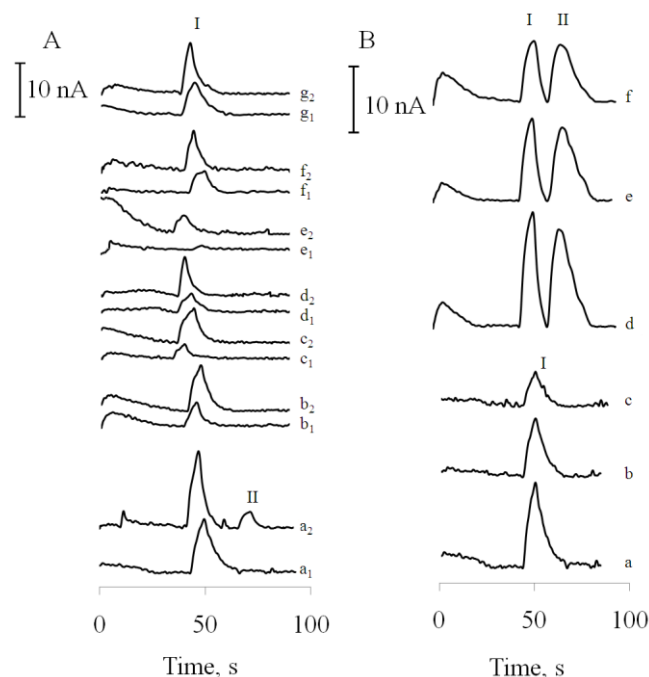


Figure IV.12: Analysis by the CSEID approach: (A) electropherograms a₁-g₁, samples; electropherograms a₂-g₂, samples doped with (+)-catechin; (a) green tea extract (diluted 1:25 v/v; only in this case a₂ also contains chlorogenic acid), (b) apple skin extract (diluted 1:5 v/v), (c) apple pulp extract (diluted 1:5 v/v), (d) pear skin extract (diluted 1:5 v/v), (e) pear pulp extract (diluted 1:5 v/v), (f) red wine (diluted 1:10 v/v), (g) white wine (diluted 1:5 v/v). (B) Sample and standard solution analysis at different detection potentials: green tea extract (diluted 1:25 v/v) at (a) E = +1.0, (b) E = +0.8 V, (c) E = +0.6 V; standard solution ((+)-catechin and gallic acid, 100 mM each); (d) E = +1.0 V, (e) E = +0.8 V, (f) E = +0.6 V. In all cases, I is the total flavonoids peak and II is the total phenolic acids peak.

One of the most remarkable inherent characteristics of the electroanalytical techniques in the field of antioxidant activity evaluation consists in the possibility they offer to determine analyte fractions with different activity only by varying the oxidation (detection) potential [84]. As shown in Figure IV.12B, in this work electrophoretic profiles were recorded at different oxidation potentials, both for the green tea extract sample (a-c) and standard solution (d-f). As expected, it may be easily seen in the figure that in both cases the current intensity decreases together with the oxidation potential. However, in this case the lower signals are representative of the antioxidant fractions with higher antioxidant activity *in vitro*.

IV.3.3.3. Individual determination of natural antioxidants

Figure IV.9B presents the separation of the nine phenolic compounds studied at the optimized conditions found (borate buffer, pH 9, 10 mM, +1.0 V) in just 260 s. This separation is probably one of the most important examples in the literature showing a high peak capacity related to single-cross microchips with amperometric detection and demonstrating the high analytical potential of these microfluidic systems. Because of the high number of compounds, besides pH, the ionic strength turned out to be one of the most important variables to optimize (Figure IV.13).

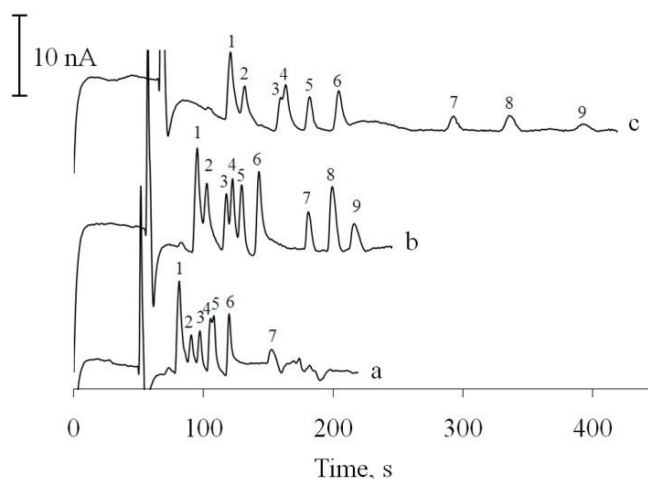


Figure IV.13: IAD approach separation conditions optimization. Effect of ionic strength: a: 5 mM, b: 10 mM, c: 15 mM; 1: (+)-catechin 80 μ M, 2: rutin 80 μ M, 3: ferulic acid 80 μ M, 4: chlorogenic acid 80 μ M, 5: vanillic acid 80 μ M, 6: quercetin 80 μ M, 7: caffeic acid 200 μ M, 8: gallic acid 80 μ M, 9: protocatechuic acid 200 μ M.

The optimum ionic strength was established at 10 mM. Hydrodynamic voltammograms for all the phenolic compounds were also recorded in order to establish the optimal detection potential (Figure IV.14). A voltage of +1.0 V was found to be the value offering the best signal-to-noise ratio and baseline stabilization time at the optimum injection and separation conditions.

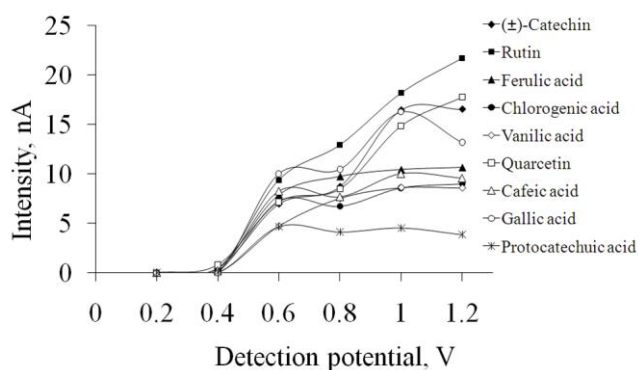


Figure IV.14: IAD approach detection potential optimization. Hydrodynamic voltammograms for all the analytes: (+)-catechin 80 μM , rutin 80 μM , ferulic acid 80 μM , chlorogenic acid 80 μM , vanillic acid 80 μM , quercetin 80 μM , caffeic acid 200 μM , gallic acid 80 μM , protocatechuic acid 200 μM . $V_{\text{separation}} = 2 \text{ kV}$, $V_{\text{injection}} = 2 \text{ kV}$, $t_{\text{injection}} = 3 \text{ s}$.

The analytical figures of merit determined for each of the phenolic compounds studied are provided in Table IV.6. The EOF showed a good stability with RSD values lower than 3.8% for all the analytes, while the resolution values are ≥ 1 . Suitable LOD and LOQ values were achieved for all the compounds except for the protocatechuic acid.

Phenolic antioxidant profiles in samples are shown in Figure IV.15. Again, the compounds' identification was performed by migration time comparison and recovery studies. As expected, the apple skin extract showed more complex composition than the pear one and the highest signals were obtained for the green tea extract. (+)-Catechin was identified in all the samples and rutin only in apple skin and green tea extracts, which was also expected since these flavonoids are characteristic for these kinds of samples.

Table IV.6: Analytical figures of merit for IAD approach.

Peak/Analyte	t_m^1, s	RSD ² , %	R _s	Calibration ³			LOD ⁴ , μM	LOQ ⁵ , μM	Precision ⁶ , RSD%
				Slope ³ , $nA \mu M^{-1}$	Intercept ³ , nA	R ²			
1 (+)- Catechin	97 ± 2	2.1		0.20 ± 0.01	- 0.5 ± 0.7	0.997	4.1	13.7	3.7
2 Rutin	106 ± 2	1.9	R _{1,2} = 1.1	0.13 ± 0.02	1.0 ± 1.0	0.992	6.1	20.3	7.0
3 Ferulic acid	121 ± 3	2.5	R _{2,3} = 1.7	0.13 ± 0.01	0.2 ± 0.5	0.996	0.6	2.0	1.5
4 Chlorogenic acid	127 ± 3	2.4	R _{3,4} = 0.9	0.13 ± 0.01	- 0.1 ± 0.5	0.995	0.7	2.2	2.6
5 Vanilic acid	134 ± 3	2.2	R _{4,5} = 1.1	0.12 ± 0.02	- 0.2 ± 1.0	0.986	6.2	20.5	3.4
6 Quercetin	149 ± 4	2.7	R _{5,6} = 1.2	0.16 ± 0.03	0.2 ± 1.5	0.990	3.0	10.1	8.5
7 Caffeic acid	200 ± 5	2.5	R _{6,7} > 2	0.11 ± 0.02	- 0.04 ± 0.7	0.990	3.4	11.4	5.5
8 Gallic acid	218 ± 7	3.2	R _{7,8} = 1.9	0.16 ± 0.02	- 0.5 ± 1.0	0.993	4.4	14.8	3.0
9 Protocatechuic acid	239 ± 9	3.8	R _{8,9} = 1.4	0.005 ± 0.32	- 0.3 ± 0.1	0.998	38.0	126.7	8.9

¹Migration time ± standard deviation, n = 3.

²EOF precision, n = 3.

³Regression equation $Y = a + bX$ where y is the amperometric current (nA) and X is concentration (μM). Slope and intercepts are expressed with confidence intervals ($\alpha = 0.05$). External calibration, 5 points.

⁴Limit of detection; based on 3σ of the lowest calibration standard (10 μM for all the analytes except protocatechuic acid for which is 100 μM).

⁴Limit of quantification; based on 10σ of the lowest calibration standard (10 μM for all the analytes except protocatechuic acids for which is 100 μM).

⁵RSD% of 5 replicates of calibration standard with concentration of 30 μM for all the analytes except protocatechuic acid for which is 400 μM .

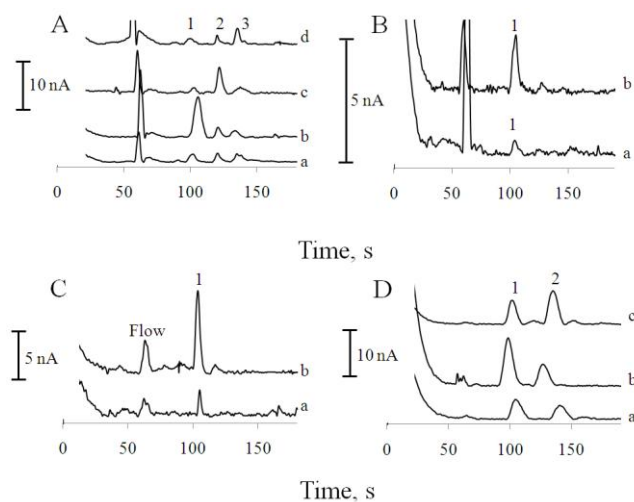


Figure IV.15: Electropherograms of samples under IAD approach conditions: (A) apple skin extract (diluted 1:5 v/v), (B) pear skin extract (diluted 1:5 v/v), (C) red wine (diluted 1:10 v/v), (D) green tea extract (diluted 1:25 v/v); (a) sample, (b) sample doped with (+)-catechin, (c) sample doped with rutin, (d) sample doped with ferulic acid. In all cases, 1 is (+)-catechin, 2 is rutin, and 3 is ferulic acid.

The recovery studies results are also provided in the Table IV.7.

Table IV.7: IAD approach accuracy evaluation.

Sample	Analyte	C _{sample} ¹	Added analyte, μM	C _{doped sample} ¹	Recovery, %
Apple skin	(\pm)- Catechin	9 \pm 2	30	41 \pm 1	106.7
	Rutin	10 \pm 2	30	36 \pm 2	86.7
	Ferulic acid	9.7 \pm 0.6	15	22.1 \pm 0.9	82.6
Pear skin	(\pm)- Catechin	6 \pm 1	10	14 \pm 1	80.0
Red wine	(\pm)- Catechin	15.8 \pm 0.5	30	44 \pm 1	94.0
Green tea	(\pm)- Catechin	25 \pm 3	30	54 \pm 1	96.7
	Rutin	19.3 \pm 0.9	30	49 \pm 1	99.0

¹ in $\mu\text{M} \pm$ confidence intervals ($n = 3$, $\alpha = 0.05$).

As in the CSEID case, the recovery values (between 80.0% and 106.7%) indicate good accuracy of this analytical approach. On the other hand, Table IV.8 lists the antioxidant levels in samples obtained for class-selective electrochemical index determination, individual antioxidant determination (corresponds to the sum of the individual antioxidant concentrations), as well as for the traditional total phenolic index (by the Folin-Ciocalteu spectrophotometric method).

From a statistical point of view, the results obtained for the same set of samples by two different analytical methods could be identical when the confidence limits of the slope and the intercept of their corresponding regression line include 1 and 0, respectively [85]. Regression lines and equations for the results obtained by the methods applied in this study are shown in Figure IV.16. A comparison between the CSEID and the IAD (Figure IV.16A) reveals that the results obtained with these two approaches are not significantly different at the 95% confidence level. On the other hand, the comparisons between each of the microchip-based approaches and the Folin-Ciocalteu method (Figures IV.16B,C) show that, following the above-mentioned criteria, lineal regressions are observed but the results are significantly different. This was expected and is probably due to the fact that, as we have already mentioned, concentration levels found by the Folin-Ciocalteu method were higher, since it is

known that this method overestimates the phenolic content [69-72]. Nevertheless, in these two cases, the good concordance with the lineal models presented indicates good correlation between the microchip based approaches and the traditional total phenolic index determination method.

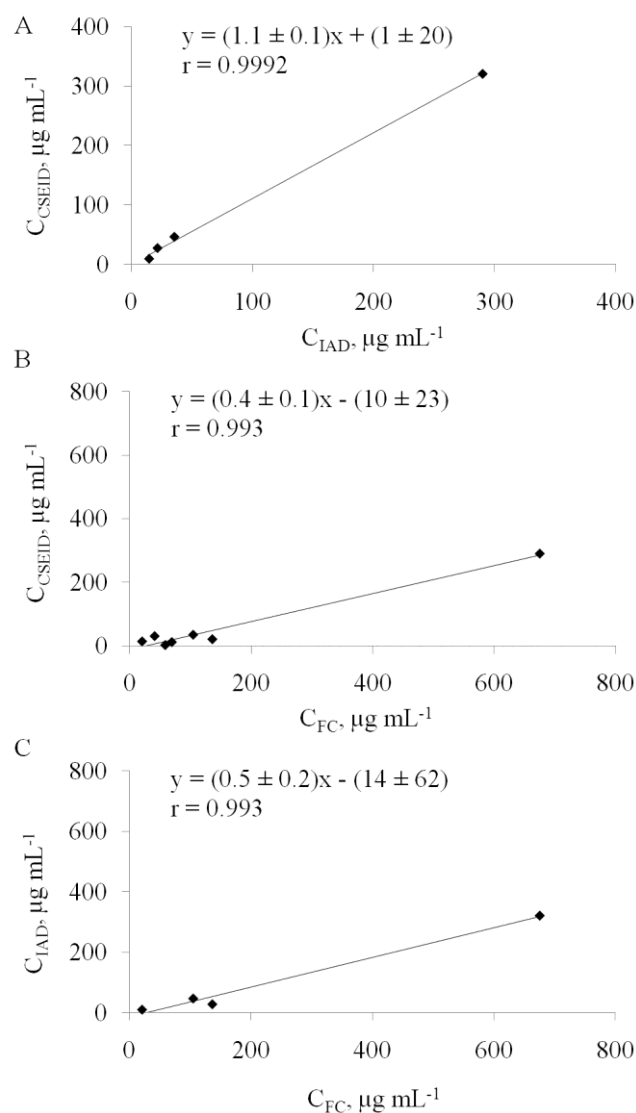


Figure IV.16: Regression analysis of the analytical methods applied in this study. A: concentrations obtained by class-selective electrochemical index determination (C_{CSEID}) vs. individual antioxidant determination (C_{IAD}); B: concentrations obtained by class-selective electrochemical index determination (C_{CSEID}) vs. Folin-Ciocalteu method (C_{FC}); C: concentrations obtained by individual antioxidant determination (C_{IAD}) vs. Folin-Ciocalteu method (C_{FC}). In all cases slope and intercept of the regression equations are given with confidence interval ($\alpha = 0.05$).

Table IV.8: Total analytes levels (in $\mu\text{g mL}^{-1} \pm$ confidence intervals, $n = 3$ $\alpha = 0.05$) in samples (extracts and wines) by CSEID, IAD and Folin-Ciocalteu method.

Sample	CSEID ¹	IAD ²	Folin-Ciocalteu method
Apple skin	21.6 \pm 0.2	27 \pm 1	136.2 \pm 0.5
Apple pulp	12.6 \pm 0.3	N. D.	69.5 \pm 0.3
Pear skin	14.7 \pm 0.3	9 \pm 1	20.6 \pm 0.1
Pear pulp	3.2 \pm 0.2	N. D.	58.6 \pm 0.3
Red wine	35.5 \pm 0.1	46 \pm 2	104.7 \pm 0.1
White wine	31.3 \pm 0.1	N. D.	41.2 \pm 0.1
Green tea	290 \pm 2	321 \pm 11	675 \pm 2

¹ Expressed as (+)-Catechin equivalent.

² Expressed as sum of all antioxidants.

N. D. - sample not determined by this approach.

IV.3.3.4. Analytical integration and simplification strategies for natural antioxidant analysis on microfluidic electrochemistry chips

Figure IV.17 shows the schematics of the analytical simplification strategies for natural antioxidant determination with the corresponding electropherograms obtained.

The first strategy consisted of the integration of the two previously studied analytical approaches (sequential class-selective electrochemical index determination at pH 5 and individual antioxidant determination at pH 9) using one microchip reservoir for the application of each. This strategy has been demonstrated for a standard solution (Figure IV.17) and green tea extract samples (Figure IV.17B). In the first case, the standard (containing two flavonoids and two phenolic acids) was injected in MES buffer at pH 5 resulting in two peaks (Figure IV.17A) corresponding to total flavonoids I ((+)-catechin and rutin) and total phenolic acids II (vanillic and chlorogenic acid). A consecutive sample injection from the same reservoir, but this time in borate buffer at pH 9, led to complete separation of the four antioxidants. Applied to green tea extracts, this strategy gave rise to the electropherograms presented in Figure IV.17B. In this case, one peak was found at pH 5, corresponding to total flavonoids, while the injection in borate buffer at pH 9 resulted in the separation of (+)-catechin and rutin.

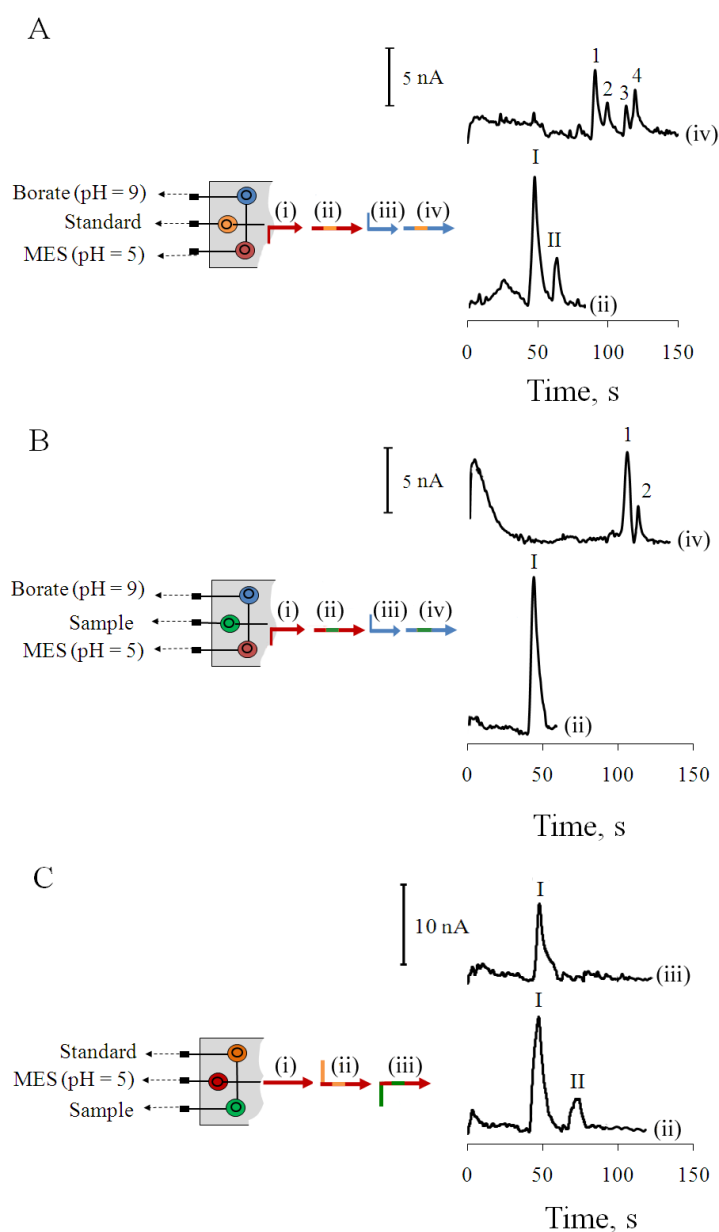


Figure IV.17: Analytical integration and simplification strategies: (A) integration of both CSEID (ii) and IAD (iv) in one microchip for a standard solution; (B) the same for green tea extract (diluted 1:25 v/v); (C) integrated one point calibration CSEID, (ii) standard solution and (iii) green tea extract (diluted 1:50 v/v). In all cases, the numbers i-iv indicate the sequential buffer flow and sample/standard injection order of the analysis: (I) total flavonoids peak, (II) total phenolic acids peak; 1 is (+)-catechin, 2 is rutin, 3 is chlorogenic acid, and 4 is ferulic acid.

The second strategy consisted of a simplified calibration and subsequent sample determination. Figure IV.17C presents the electrochromatograms obtained for a calibration standard solution (containing (+)-catechin and gallic acid), injected by one of the microchip reservoirs (electrochromatogram ii), and the following total flavonoids CSEID in the sample,

injected by the other reservoir (electropherograms iii). The determination procedure is performed as follows: the calibration factor for each peak is calculated by the electropherogram obtained for the calibration standard using the formula $f=S_{standard}/C_{standard}$, where f is the calibration factor, S is the signal obtained, and C is the concentration of the compound(s) corresponding to the peak; then, the analyte concentration in the sample is obtained by the formula $C_{sample}=S_{sample}/f$.

Key analytical parameters, obtained by both simplification strategies, are gathered in Table IV.9, revealing their viability. On the one hand, high stability was obtained for the standard and the sample solutions' migration time, independently from the strategy used. On the other hand, quantitative levels obtained for the samples are in excellent agreement not only between the two analytical simplification strategies but also with those obtained for the previously commented analytical approaches (see data for green tea extract in Table IV.9). Indeed, the quantitative level in the green tea extract for total flavonoids by integrated class-selective electrochemical index determination ($316 \mu\text{g mL}^{-1}$) is very close to the one obtained at pH 9 (where the sum of (+)-catechin and rutin levels was $335 \mu\text{g mL}^{-1}$), as well as the levels obtained by integrated simplified calibration ($310 \mu\text{g mL}^{-1}$). These last results reveal that the microfluidic chips are moving toward

Table IV.9: Parameters of simplified approaches on microfluidic chips.

Analytical approaches integration							CSEID with integrated calibration					
CSEID (pH 5)				IAD (pH 9)			Calibration		Analysis			
Peak	t_m^1, s	t_m^2, s	$C^3, \mu\text{g mL}^{-1}$	Analyte	t_m^1, s	t_m^2, s	$C^3, \mu\text{g mL}^{-1}$	Peak	t_m^1, s	Peak	T^2, s	$C^3, \mu\text{g mL}^{-1}$
I Flavonoids	46 ± 1	44 ± 2	316 ± 15	(+)- Catechin	91 ± 1	104 ± 2	177 ± 16	I Flavonoids	47 ± 2	I Flavonoids	47 ± 2	310 ± 13
				Rutin	99 ± 1	111 ± 2	158 ± 11					
II Phenolic acids	62 ± 2	not detected	not detected	Chlorogenic acid	113 ± 2	not detected	not detected	II Phenolic acids	72 ± 3	II Phenolic acids	not detected	not detected
				Vanillic acid	120 ± 3	not detected	not detected					

¹ Migration time obtained for standard solution \pm standard deviation, $n=3$.

² Migration time obtained for the sample.

³ Concentration in green tea extracts, \pm confidence intervals ($n=3 \alpha=0.05$).

IV.3.4. Conclusions

Regarding the results obtained and exposed above, it might be concluded that microfluidic chips are a viable and attractive tool for natural antioxidant determination in foods. The analytical approaches described combine the possibilities offered by the traditionally used spectrophotometric and electrophoretic methods on a single microfluidic platform, decreasing the analysis times and the reagents consumption. Additionally, the analytical simplification strategies described open new possibilities for in situ antioxidant determination. In the authors' opinion, the present study might be yet another step toward the real-life application of microfluidic chips. Although, in this study nonprominent antioxidants were not detected in the samples when applying the individual antioxidant determination approach, it should not be considered as shortcoming since antioxidants with high significance were detected without exception. It might be due to the lack of sample preconcentration off- and/or on-chip. The latter is still one of the most important drawbacks of microfluidics: the complete integration of sample preparation on the board of microfluidic platforms. On the other hand, the high resolving being reliable analytical laboratory systems. power demonstrated (nine peaks in 260 s) is encouraging for future improvements in sample pretreatment and detection enhancement.

IV.4. Referencias

- [1]. A. Manz, N. Graber y H.M. Widmer, *Miniaturized total chemical analysis systems: A novel concept for chemical sensing*, Sens. Actuators, B, 1990, **1**, 244.
- [2]. A. Manz y J.C.T. Eijkel, *Miniaturization and chip technology. What can we expect?*, Pure Appl. Chem., 2001, **73**, 1555.
- [3]. A. Ríos, A. Escarpa y B. Simonet, *Miniaturization of Analytical Systems: Principles, Designs and Applications*, Jonh Wiley and Sons Ltd., 2009.
- [4]. G.M. Whitesides, *The origins and the future of microfluidics*, Nature, 2006, **442**, 368.
- [5]. D. Janasek, J. Franzke y A. Manz, *Scaling and the design of miniaturized chemical-analysis systems*, Nature, 2006, **442**, 374.
- [6]. P.S. Dittrich, K. Tachikawa y A. Manz, *Micro total analysis systems. Latest advancements and trends*, Anal. Chem., 2006, **78**, 3887.
- [7]. R. Daw y J. Finkelstein, *Lab on a chip*, Nature, 2006, **442**, 367.
- [8]. <http://www.genomics.agilent.com>, Agilent Technologies, 2013.
- [9]. <http://www.analytik-jena.de/en/life-science/products>, Analytik Jena AG, 2013.
- [10]. A. Escarpa, M.C. González, M.A. López, A.G. Crevillén, M. Hervás y M. García, *Microchips for CE: Breakthroughs in real-world food analysis*, Electrophoresis, 2008, **29**, 4852.
- [11]. A.G. Crevillén, M. Hervás, M.A. López, M.C. González y A. Escarpa, *Real sample analysis on microfluidic devices*, Talanta, 2007, **74**, 342.
- [12]. J.P. Landers, *"Introduction to capillary electrophoresis"*, en *"Capillary and microchip electrophoresis and associated microtechniques"*, J.P. Landers (ed.), Taylor and Francis Inc., 2008, p. 3.
- [13]. P.N. Nge, C.I. Rogers y A.T. Woolley, *Advances in microfluidic materials, functions, integration, and applications*, Chem. Rev., 2013, **113**, 2550.
- [14]. J. Kim, E.C. Jensen, M. Megens, B. Boser y R.A. Mathies, *Integrated microfluidic bioprocessor for solid phase capture immunoassays*, Lab Chip, 2011, 3106.
- [15]. M.A. García, M.L. Marina, A. Ríos y M. Valcárcel, *"Separation modes in capillary electrophoresis"*, en *"Analysis and detection by capillary electrophoresis"*, M.L. Marina, A. Ríos y M. Valcárcel (ed.), Elsevier Science Publisher B.V., 2005.

- [16]. I. Mitra, Z. Zhuang, Y. Zhang, C.-Y. Yu, Z.T. Hammoud, H. Tang, Y. Mechref y S.C. Jacobson, *N-glycan profiling by microchip electrophoresis to differentiate disease states related to esophageal adenocarcinoma*, *Anal. Chem.*, 2012, **84**, 3621.
- [17]. M.C. Breadmore, A.I. Shallan, H.R. Rabanes, D. Gstoettenmayr, A.S. Abdul Keyon, A. Gaspar, M. Dawod y J.P. Quirino, *Recent advances in enhancing the sensitivity of electrophoresis and electrochromatography in capillaries and microchips (2010–2012)*, *Electrophoresis*, 2013, **34**, 29.
- [18]. W. Thormann, J. Caslavská y R.A. Mosher, *Modeling of electroosmotic and electrophoretic mobilization in capillary and microchip isoelectric focusing*, *J. Chromatogr. A*, 2007, **1155**, 154.
- [19]. Z. Liu, J. Ou, R. Samy, T. Glawdel, T. Huang, C.L. Ren y J. Pawliszyn, *Side-by-side comparison of disposable microchips with commercial capillary cartridges for application in capillary isoelectric focusing with whole column imaging detection*, *Lab Chip*, 2008, **8**, 1738.
- [20]. J.C. Sanders, Z. Huang y J.P. Landers, *Acousto-optical deflection-based whole channel scanning for microchip isoelectric focusing with laser-induced fluorescence detection*, *Lab Chip*, 2001, **1**, 167.
- [21]. P. Nandi, D.P. Desai y S.M. Lunte, *Development of a PDMS-based microchip electrophoresis device for continuous online in vivo monitoring of microdialysis samples*, *Electrophoresis*, 2010, **31**, 1414.
- [22]. A.B. Jemere, R.D. Oleschuk y D.J. Harrison, *Microchip-based capillary electrochromatography using packed beds*, *Electrophoresis*, 2003, **24**, 3018.
- [23]. K.B. Mogensen y J.P. Kutter, *Carbon nanotube based stationary phases for microchip chromatography*, *Lab Chip*, 2012, **12**, 1951.
- [24]. A. Fonverne, F. Ricoul, C. Demesmay, C. Delattre, A. Fournier, J. Dijon y F. Vinet, *In situ synthesized carbon nanotubes as a new nanostructured stationary phase for microfabricated liquid chromatographic column*, *Sens. Actuators, B*, 2008, **129**, 510.
- [25]. Y. Ladner, G. Crétier y K. Faure, *Electrochromatography in cyclic olefin copolymer microchips: a step towards field portable analysis*, *J. Chromatogr. A*, 2010, **1217**, 8001.

- [26]. C. Iliescu, H. Taylor, M. Avram, J. Miao y S. Franssila, *A practical guide for the fabrication of microfluidic devices using glass and silicon*, *Biomicrofluidics*, 2012, **6**, 165.
- [27]. E.S. Fakunle y I. Fritsch, *Redox-magnetohydrodynamic microfluidics without channels and compatible with electrochemical detection under immunoassay conditions*, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2010, **398**, 2605.
- [28]. M. Goldbach, H. Axthelm y M. Keusgen, *LTCC-based microchips for the electrochemical detection of phenolic compounds*, *Sens. Actuators, B*, 2006, **120**, 346.
- [29]. S. Aura, T. Sikanen, T. Kotiaho y S. Franssila, *Novel hybrid material for microfluidic devices*, *Sens. Actuators, B*, 2008, **132**, 397.
- [30]. C.-W. Tsao y D. DeVoe, *Bonding of thermoplastic polymer microfluidics*, *Microfluid. Nanofluid.*, 2009, **6**, 1.
- [31]. Y. Wang, H. Chen, Q. He y S.A. Soper, *A high-performance polycarbonate electrophoresis microchip with integrated three-electrode system for end-channel amperometric detection*, *Electrophoresis*, 2008, **29**, 1881.
- [32]. P.-C. Chen, D.S. Park, B.-H. You, N. Kim, P. T., S.A. Soper, D.E. Nikitopoulos y M.C. Murphy, *Titer-plate formatted continuous flow thermal reactors: Design and performance of a nanoliter reactor*, *Sens. Actuators, B*, 2010, **149**, 291.
- [33]. W. Yang, M. Yu, X. Sun y A.T. Woolley, *Microdevices integrating affinity columns and capillary electrophoresis for multibiomarker analysis in human serum*, *Lab Chip*, 2010, **10**, 2527.
- [34]. X. Li, D.R. Ballerini y W. Shen, *A perspective on paper-based microfluidics: Current status and future trends*, *Biomicrofluidics*, 2012, **6**, 011301.
- [35]. A.W. Martinez, S.T. Phillips, G.M. Whitesides y E. Carrilho, *Diagnostics for the developing world: Microfluidic paper-based analytical devices*, *Anal. Chem.*, 2009, **82**, 3.
- [36]. A. Wu, L. Wang, E. Jensen, R. Mathies y B. Boser, *Modular integration of electronics and microfluidic systems using flexible printed circuit boards*, *Lab Chip*, 2010, **10**, 519.
- [37]. O. Geschke, H. Klank y P. Tellesmann (ed.), *Microsystem engineering of lab-on-a-chip devices*, WILEY-VCH Verlag and Co., 2004.

- [38]. M.J. Madou, *Fundamentals of Microfabrication (The Science of Miniaturization)*, CRC Press, 2000.
- [39]. A.J. Blasco, *Nuevas aproximaciones electroanalíticas para el análisis de antioxidantes naturales en escalados convencional y miniaturizado*, Departamento de Química Analítica e Ingeniería Química, Alcalá de Henares, 2007.
- [40]. V. Dolník, S. Liu y S. Jovanovich, *Capillary electrophoresis on microchip. (Review)*, *Electrophoresis*, 2000, **21**, 41.
- [41]. M.M. Crain, R.S. Keynton, K.M. Walsh, T.J. Russel, R.P. Baldwin, J.F. Naber y D.J. Jackson, "*Microchip fabrication methods*", en "*Microchip capillary electrophoresis*", C.S. Henry (ed.), Humana Press Inc., 2006, p. 13.
- [42]. J.L. Felhofer, L. Blandes y C.D. Garcia, *Recent developments in instrumentation for capillary electrophoresis and microchip-capillary electrophoresis*, *Electrophoresis*, 2010, **31**, 2469.
- [43]. B. Kuswandi, J. Nuriman, J. Huskens y W. Verboom, *Advances in passive sampling in environmental studies*, *Anal. Chim. Acta*, 2007, **601**, 141.
- [44]. A.R. Timerbaev, *Element speciation analysis using capillary electrophoresis: twenty years of development and applications*, *Chem. Rev.*, 2013, **113**, 778.
- [45]. C.A. Nesbitt, H. Zhang y K.K.C. Yeung, *Recent applications of capillary electrophoresis–mass spectrometry (CE–MS): CE performing functions beyond separation*, *Anal. Chim. Acta*, 2008, **627**, 3.
- [46]. P. Kubán y P.C. Hauser, *A review of the recent achievements in capacitively coupled contactless conductivity detection*, *Anal. Chim. Acta*, 2008, **607**, 15.
- [47]. C.W. Klampfl, *Recent advances in the application of capillary electrophoresis with mass spectrometric detection*, *Electrophoresis*, 2006, **27**, 3.
- [48]. A.R. Timerbaev, *Capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry for biospeciation analysis: critical evaluation*, *Trends Anal. Chem.*, 2009, **28**, 416.
- [49]. J. Li y J.C. Richards, *Application of capillary electrophoresis mass spectrometry to the characterization of bacterial lipopolysaccharides*, *Mass Spectrom. Rev.*, 2007, **26**, 35.
- [50]. J.D. Trumbull, I.K. Glasgow, D.J. Beebe y R.L. Magin, *Integrating microfabricated fluidic systems and NMR spectroscopy*, *Trans. Biomed. Eng.*, 2000, **47**, 3.

- [51]. C.D. Whitmore, D. Essaka y N.J. Dovichi, *Six orders of magnitude dynamic range in capillary electrophoresis with ultrasensitive laser-induced fluorescence detection*, *Talanta*, 2009, **80**, 744.
- [52]. S. Gotz y U. Karst, *Wavelength-resolved fluorescence detector for microchip capillary electrophoresis separations*, *Sens. Actuators, B*, 2007, **123**, 622.
- [53]. B. Yang, H. Tian, J. Xu y Y. Guan, *An integrated light emitting diode-induced fluorescence detector for capillary electrophoresis*, *Talanta*, 2006, **69**, 996.
- [54]. X. Xu, S. Zhang, H. Chen y J. Kong, *Integration of electrochemistry in micro-total analysis systems for biochemical assays: Recent developments*, *Talanta*, 2009, **80**, 8.
- [55]. W.R. Vandaveer, S.A. Pasas, R.S. Martin y S.M. Lunte, *Recent developments in amperometric detection for microchip capillary electrophoresis*, *Electrophoresis*, 2002, **23**, 3667.
- [56]. S.R. Wallenborg, L. Nyholm y C.E. Lunte, *End-column amperometric detection in capillary electrophoresis: Influence of separation-related parameters on the observed half-wave potential for dopamine and catechol*, *Anal. Chem.*, 1999, **71**, 544.
- [57]. Y. Ding, A. Ayon y C.D. Garcia, *Electrochemical detection of phenolic compounds using cylindrical carbon-ink electrodes and microchip capillary electrophoresis*, *Anal. Chim. Acta*, 2007, **584**, 2441.
- [58]. J. Wang, M. Pumera, M.P. Chatrathi, A. Escarpa, M. Musameh, G. Collins, A. Mulchandai, Y. Li y K. Olsen, *Single-channel microchip for fast screening and detailed identification of nitroaromatic explosives or organophosphate nerve agents*, *Anal. Chem.*, 2002, **74**, 1187.
- [59]. R.S. Martin, K.L. Ratzlaff, B.H. Huynh y S.M. Lunte, *In-channel electrochemical detection for microchip capillary electrophoresis using an electrically isolated potentiostat*, *Anal. Chem.*, 2002, **74**, 1136.
- [60]. J.A. Vickers y C.S. Henry, *Simplified current decoupler for microchip capillary electrophoresis with electrochemical and pulsed amperometric detection*, *Electrophoresis*, 2005, **26**, 4641.
- [61]. N.A. Lacher, K.E. Garrison, R.S. Martín y S.M. Lunte, *Microchip capillary electrophoresis / electrochemistry*, *Electrophoresis*, 2001, **22**, 2526.

- [62]. A.G. Crevillén, M. Ávila, M. Pumera, M.C. González y A. Escarpa, *Food Analysis on Microfluidic Devices Using Ultrasensitive Carbon Nanotubes Detectors*, Anal. Chem., 2007, **79**, 7408.
- [63]. R. Mukhopadhyay, *Microfluidics: On the Slope of Enlightenment*, Anal. Chem., 2009, **81**, 4169.
- [64]. A. Ríos, A. Escarpa, M.C. González y A.G. Crevillén, *Challenges of analytical microsystems*, Trends Anal. Chem., 2006, **25**, 476.
- [65]. S. Haerberle y R. Zengerle, *Microfluidic platforms for lab-on-a-chip applications*, Lab Chip, 2007, **7**, 1094.
- [66]. T. Revermann, S. Götz, J. Künemeyerb y U. Karst, *Quantitative analysis by microchip capillary electrophoresis – current limitations and problem-solving strategies*, Analyst, 2008, **133**, 167.
- [67]. D. Huang, B. Ou y R.L. Prior, *The chemistry behind antioxidant capacity assays*, J. Agric. Food Chem., 2005, **53**, 1841.
- [68]. A.J. Blasco, A.G. Crevillén, M.C. González y A. Escarpa, *Direct electrochemical sensing and detection of natural antioxidants and antioxidant capacity in vitro systems*, Electroanalysis, 2007, **19**, 2275.
- [69]. K. Robards y M. Antolovich, *Analytical chemistry of fruit bioflavonoids: A Review*, Analyst, 1997, **122**, 11R.
- [70]. A. Escarpa y M.C. González, *Approach to the content of total extractable phenolic compounds from different food samples by comparison of chromatographic and spectrophotometric methods*, Anal. Chim. Acta, 2001, **427**, 119.
- [71]. M. Gamella, S. Campuzano, A.J. Reviejo y J.M. Pingarrón, *Electrochemical estimation of the polyphenol index in wines using a laccase biosensor*, J. Agric. Food Chem., 2006, **54**, 7960.
- [72]. M.S. Padda y D.H. Picha, *Methodology optimization for quantification of total phenolics and individual phenolic acids in sweetpotato (Ipomoea batatas L.) roots*, Food Chem. Toxicol., 2007, **72**, C412
- [73]. J. Wang, W. Siangproh, A.J. Blasco, O. Chailapakul y A. Escarpa, *Microchip device for rapid screening and fingerprint identification of phenolic pollutants* Anal. Chim. Acta, 2006, **556**, 301.

- [74]. A.J. Blasco, I. Barrigas, M.C. González y A. Escarpa, *Fast and simultaneous detection of prominent natural antioxidants using analytical microsystems for capillary electrophoresis with a glassy carbon electrode: A new gateway to food environments*, *Electrophoresis*, 2005, **26**, 4664.
- [75]. R.W. Hompesch, C.D. García, D.J. Weiss, J.M. Vivancod y C.S. Henry, *Analysis of natural flavonoids by microchip-micellar electrokinetic chromatography with pulsed amperometric detection*, *Analyst*, 2005, **130**, 694.
- [76]. Y. Ding, M.F. Mora y C.D. Garcia, *Analysis of alkyl gallates and nordihydroguaiaretic acid using plastic capillary electrophoresis – microchips*, *Anal. Chim. Acta*, 2006, **561**, 126.
- [77]. M. Goldbach, H. Axthelm y M. Keusgen, *LTCC-based microchips for the electrochemical detection of phenolic compounds*, *Sens. Actuators, B*, 2006, **120**, 346.
- [78]. M. Amatatongchai, O. Hofmann, D. Nacapricha, O. Chailapakul y A.J. de Mello, *A microfluidic system for evaluation of antioxidant capacity based on a peroxyoxalate chemiluminescence assay*, *Anal. Bioanal Chem.*, 2007, **387**, 277.
- [79]. M. Scampicchio, J. Wang, S. Mannino y M.P. Chatrathi, *Microchip capillary electrophoresis with amperometric detection for rapid separation and detection of phenolic acids*, *J. Chromatogr. A*, 2004, **1049**, 189.
- [80]. K. Tsukagoshi, T. Saito y R. Nakajima, *Analysis of antioxidants by microchip capillary electrophoresis with chemiluminescence detection based on luminol reaction*, *Talanta*, 2008, **77**, 514.
- [81]. S.V. Jovanovic, S. Steeden, M. Tomic, B. Marjanovic y M.G. Simicg, *Flavonoids as Antioxidants*, *J. Am. Chem. Soc.*, 1994, **116**, 4846.
- [82]. J.L. Beltrán, N. Sanli, G. Fonrodona, D. Barrón, G. Özkan y J. Barbosa, *Spectrophotometric, potentiometric and chromatographic pKa values of polyphenolic acids in water and acetonitrile–water media*, *Anal. Chim. Acta*, 2003, **484**, 253.
- [83]. <http://www.sigmaaldrich.com>, Sigma Aldrich GmbH, 2009.
- [84]. A.J. Blasco, M.C. Rogerio, M.C. González y A. Escarpa, *“Electrochemical Index” as a screening method to determine total polyphenolics in foods: A Proposal*, *Anal. Chim. Acta*, 2005, **539**, 237.
- [85]. J.N. Miller y J.C. Miller, *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, Pearson Education Ltd., 2000.

V. CAPITULO 4

MEJORAS EN LA ESPECIACIÓN ELEMENTAL MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA ATÓMICA BASADA EN PLASMA DE ACOPLAMIENTO INDUCTIVO: UTILIZACIÓN DE NEBULIZACIÓN “FLOW FOCUSING”®

V.1. Introducción

En general, *especiación elemental* se podría definir como la determinación de las especies químicas particulares de un elemento en una muestra [1]. La forma química en la que se encuentran los elementos en los sistemas medioambientales o en los organismos vivos puede influir de forma significativa en sus propiedades bioquímicas, su toxicidad, su movilidad y su biodisponibilidad [2,3].

En la actualidad se puede observar un aumento en la importancia de las aplicaciones analíticas que proporcionan información sobre la distribución de los especies de distintos elementos, siendo el desarrollo de nuevos métodos de especiación una tendencia muy importante en la investigación analítica. Algunas áreas relevantes de aplicación de la especiación elemental se muestran en Figura V.1 ([4]).



Figura V.1: Campos de aplicación de la especiación elemental [4].

Los efectos tóxicos de conocidas formas metálicas (e.g., organoplúmbicos, organoestánicos, especies de mercurio, entre otros) en sistemas de interés medioambiental (i.e., aire, aguas naturales, sedimentos, suelos) se han estudiado ampliamente y han constituido el núcleo central del desarrollo del análisis de especiación [5]. Consecuencia directa del mejor conocimiento de la toxicidad de ciertas especies es la aparición de regulaciones y legislación dedicada al tema, aunque ésta última diste mucho de ser específica. Otros objetivos secundarios de la investigación de las diversas especies químicas de un elemento son la evaluación de los efectos de una

exposición prolongada a niveles de concentración bajos, los estudios de transformación biológica y geológica, y la mejora de la calidad de los resultados analíticos para la implantación de sistemas de control. No obstante, existen otros muchos sectores interesados en la determinación de las diversas especies de metales y metaloides, fundamentalmente en el control de procesos industriales, la industria relacionada con la alimentación, y las áreas de bioquímica y farmacia [4].

El importante desarrollo actual de la especiación elemental ha sido posible gracias a los importantes avances experimentales en la tecnología y en las herramientas que dispone la Química Analítica. Dichos avances han permitido realizar separaciones y detecciones con suficiente sensibilidad y precisión para distinguir las distintas especies de los elementos, las cuales a menudo se encuentran en concentraciones muy bajas y en matrices reales de alta complejidad.

V.1.1. Técnicas analíticas empleadas en la especiación elemental

Una técnica analítica sería adecuada para la especiación elemental si posee una serie de características entre las cuales se podrían destacar las siguientes [3]:

- Poseer un gran poder de separación (resolución de la señal analítica), para poder distinguir entre distintas especies iónicas y neutras en matrices complejas;
- Tener la capacidad de identificar y cuantificar un determinado compuesto atendiendo a su estructura química;
- Poseer una gran capacidad de detección, para poder cuantificar las especies a niveles de concentración muy bajos;
- Tener el menor impacto posible sobre el estado químico de las especies en la muestra, con el fin de prevenir pérdidas de información específica y comprometer así el análisis;
- Tener buena tolerancia a matrices complejas (medioambientales y biológicas, entre otras) o integrar de etapa de preparación de la muestra tal que los analitos sean separados de la matriz sin que la forma química de éstos cambie;
- Poseer las siguientes ventajas: facilidad en la implementación del método, bajos costes, volúmenes de muestra reducidos (importante para algunas aplicaciones biológicas) y generación mínima de residuos, entre otros.

Los procedimientos de análisis desarrollados y utilizados para especiación elemental consisten, al menos, de dos etapas generales: (i) separación de las especies y; (ii) su detección. Las principales técnicas que han sido usadas para tales fines se muestran en las Figuras V.2 y V.3 ([5]), respectivamente.

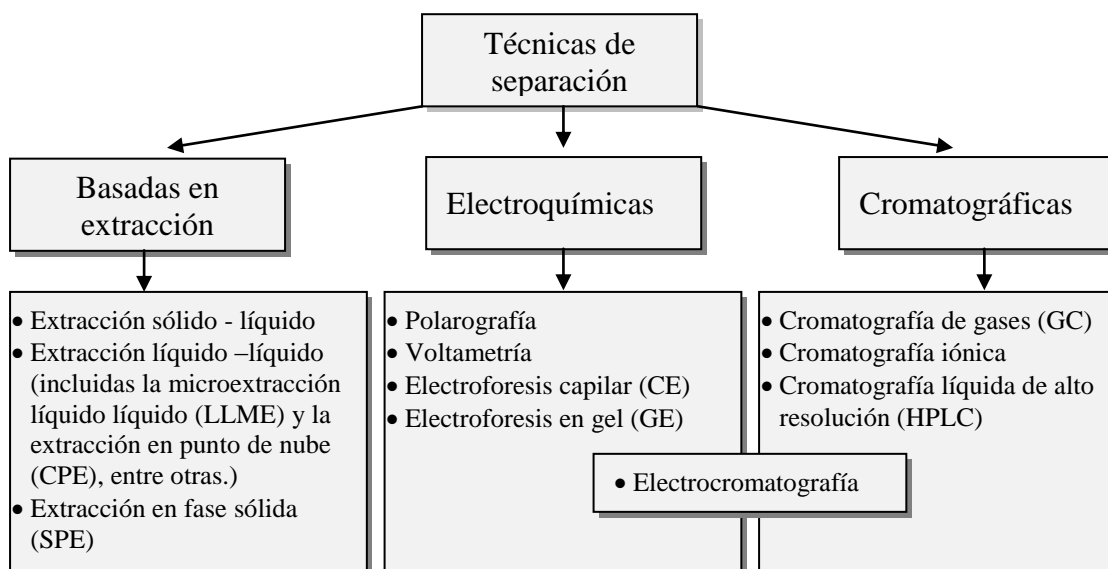


Figura V.2: Técnicas de separación empleadas en especiación elemental.

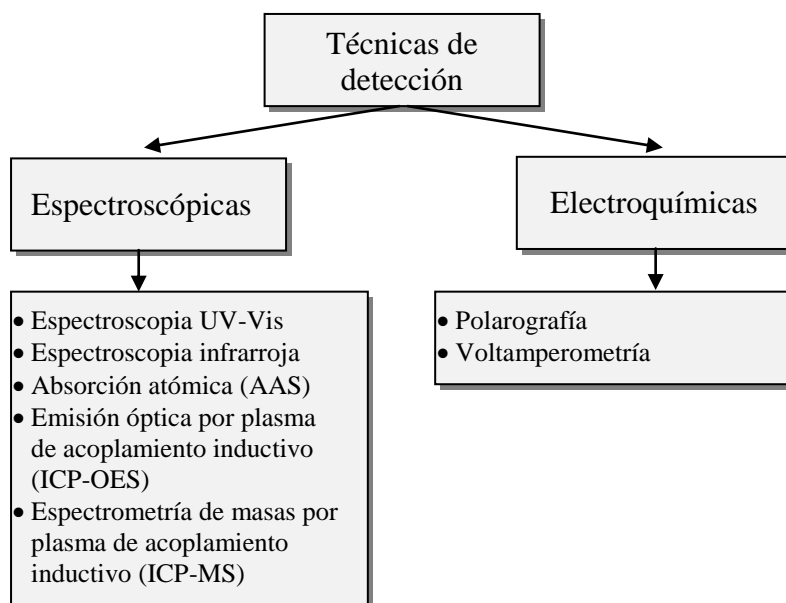


Figura V.3: Técnicas de detección empleadas en especiación elemental [5].

En la literatura científica se puede encontrar una gran variedad de técnicas y métodos de especiación elemental, desarrollados y aplicados a diferentes tipos de muestras

reales. Entre ellos, los que mejores resultados han dado son las denominadas *técnicas híbridas* (“*hyphenated techniques*”) que consisten en el acoplamiento de una técnica de separación cromatográfica o electroforética a un detector atómico sensible, como pueden ser los espectrómetros ópticos y de masas basados en plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES e ICP-MS) [3]. Entre estas técnicas híbridas la combinación HPLC-ICP-MS es la que ha sido más estudiada y la que más posibilidades analíticas ofrece en el campo de la especiación elemental [6-8]. Esto se debe al gran poder resolutivo de la cromatografía líquida de alta resolución y a la excelente sensibilidad de la espectrometría de masas por plasma de acoplamiento inductivo, además de su capacidad de detección multielemental. Sin embargo, HPLC-ICP-MS presenta también algunas desventajas las que, hoy por hoy, impiden que ésta se convierta en una herramienta de rutina para la especiación elemental. Entre dichas desventajas están la complejidad en el diseño de la técnica, el alto coste de los instrumentos y el carácter poco ecológico de los disolventes empleados como fase móvil, entre otros. El problema más importante es que las interacciones que a menudo tienen lugar entre la fase estacionaria de las columnas y las especies del analito pueden modificar la forma química de éste. Esto ocurre sobre todo sobre todo en los casos de complejos relativamente lábiles de distintos metales [3]. Una técnica de separación alternativa, que carece de las desventajas de la HPLC, es la electroforesis capilar (CE).

V.1.2. Electroforesis capilar (CE) en la especiación elemental

Desde las primeras aplicaciones de la electroforesis capilar para especiación elemental, realizadas en la década de los 90 del siglo XX, esta técnica ha experimentado un constante aumento en el número de publicaciones científicas, analitos estudiados y aplicaciones a muestras reales [5]. Esto se debe a una serie de ventajas inherentes a la CE, en comparación con las técnicas de cromatografía líquida, entre las que se encuentran las siguientes [9]:

- Las condiciones de separación en CE son “suaves” para la forma química específica de los analitos de interés. La separación ocurre dentro de un capilar de sílice fundida, normalmente sin relleno, en un medio acuoso, sin valores de pH extremos;

- Una gran parte de las muestras medioambientales y biológicas pueden ser directamente sometidas a separación, sin necesidad de utilizar un tratamiento previo. Los capilares abiertos (sin relleno) de diámetro típico entre 0.5 y 200 μm permiten la inyección directa de la muestra con un menor riesgo de bloqueo que las columnas empaquetadas;
- Posee un gran poder de resolución, con posibilidad de separar en un único ensayo desde iones de metales con tamaño pequeño hasta biomoléculas grandes. El perfil plano del flujo electroosmótico conduce a una menor difusión entre las zonas de los analitos a lo largo del capilar de separación, en comparación con el perfil parabólico del flujo dentro de las columnas cromatográficas;
- Presenta posibilidades excepcionales de separación en micromuestras, debido al consumo de muestra muy bajo. Debido al tamaño reducido de los capilares de separación, el consumo típico de muestra es de unos pocos nanolitros;
- Carácter ecológico de los disolventes empleados. Se usan como fase portadora tampones acuosos con valores de pH moderados;
- Bajo coste inicial de la instrumentación y de funcionamiento.

V.1.3. Aspectos fundamentales de la electroforesis capilar

El mecanismo de separación en la electroforesis capilar se basa en las diferencias en la movilidad electroforética de especies con distintas relaciones masa/carga (m/q). Dentro de un capilar lleno de disolución tampón y bajo la acción de un campo eléctrico aplicado entre los dos lados de dicho capilar (Figura V.4, [10]) la migración de los componentes de una muestra se debe a los siguientes factores:

- Movilidad electroforética (μ_{ep}), relacionada con la migración de las especies cargadas hacia el polo del campo eléctrico de carga opuesta:

$$\mu_{ep} = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad (\text{V.1})$$

donde q es la carga del ion, η es la viscosidad de la disolución portadora y r es el radio del ion;

- Movilidad electroosmótica (μ_{eo}), la que se debe al flujo electroosmótico dentro del capilar y afecta el movimiento tanto de las especies cargadas como de las especies neutras. Se define por la siguiente ecuación:

$$\mu_{eo} = \left(\frac{\varepsilon_0 \varepsilon \zeta}{4\pi\eta} \right) \quad (V.2)$$

donde ε_0 es la constante dieléctrica del vacío, ε es la constante dieléctrica del tampón y ζ es el potencial zeta y η es la viscosidad de la disolución portadora.

La movilidad resultante, denominada movilidad observada (μ_{obs}), es la que caracteriza el movimiento de los componentes de la muestra y se expresa mediante la siguiente ecuación:

$$\mu_{obs} = E (\mu_{eo} + \mu_{ep}) \quad (V.3)$$

donde E es el potencial aplicado (en kV).

La manera más común de caracterizar la separación de dos especies es mediante el factor de resolución (R_s) que se define como la relación entre la diferencia entre los tiempos de retención de los dos picos correspondientes y la anchura media de éstos:

$$R_s = 2 (t_2 - t_1) / (w_1 + w_2) \quad (V.4)$$

donde t_1 y t_2 con los tiempos de retención correspondientes a los dos picos, y w_1 y w_2 son las anchuras de estos.

Según la Ecuación V.3 la movilidad observada para las especies cargadas y neutras es distinta. Además, las especies con misma carga poseen distintas movilidades observadas ya que dependen de su radio (ecuación V.1), lo que permite su separación.

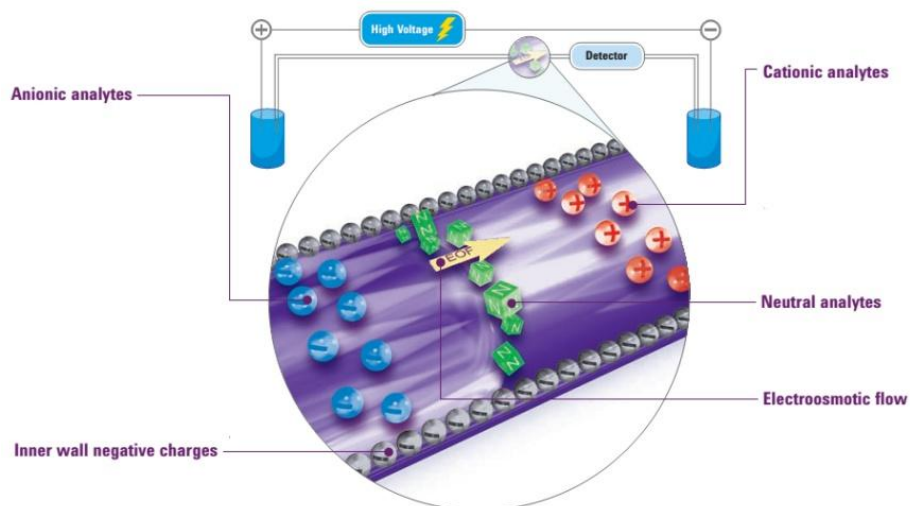


Figura V.4: Separación electroforética de los componentes de una muestra dentro de un capilar de sílice fundida [10].

V.1.4. Aplicación de la electroforesis capilar en especiación elemental

Las características y ventajas de la electroforesis capilar en la especiación elemental, discutidas anteriormente, han permitido su utilización en el análisis de una gran cantidad de analitos y muestras. Una visión exhaustiva de las aplicaciones está fuera de los objetivos de esta introducción; sin embargo, en la literatura se pueden encontrar varios libros y revisiones excelentes [3,5,11,12].

Dependiendo de su naturaleza química los analitos relevantes podrían ser divididos en las siguientes categorías [3,13]:

- Iones de metales con distintos estados de oxidación. En la Tabla V.1 se muestra una lista de los estados de oxidación de una serie de iones de metales tóxicos;
- Complejos de metales con ligandos de diferente naturaleza:
 - Inorgánicos;
 - Orgánicos;
 - Bioligandos (macromoléculas biológicas);
- Compuestos organometálicos;
- Oxoaniones y otras bioformas de metalóides;
- Especies no metálicas (e.g., NO_2^- , NO_3^- y biomoléculas que contienen fósforo, entre otras).

Tabla V.1: Estados de oxidación de algunos metales tóxicos [5].

Ion metálico	Grado de oxidación
As	As(III) y As(V)
Cd	Cd(I) y Cd(II)
Cu	Cu(I) y Cu(II)
Cr	Cr(III) y Cr(VI)
Co	Co(II) y Co(III)
Hg	Hg(I) y Hg(II)
Fe	Fe(II) y Fe(III)
Mn	Mn(I) y Mn(II)
Ni	Ni(II) y Ni(III)
Pb	Pb(II) y Pb(IV)
Sb	Sb(III) y Sb(V)
Se	Se(IV) y Se(VI)
Ti	Ti(II), Ti(III), y Ti(IV)
Zn	Zn(I) y Zn(II)

V.1.5. Sistemas de detección usados en electroforesis capilar

La detección es la parte quizás más crítica en la especiación elemental mediante electroforesis capilar. A pesar de la gran variedad de detectores usados en combinación con CE, obtener una alta sensibilidad sigue siendo un reto importante ya que los estrechos diámetros de los capilares utilizados en CE y/o los flujos del orden de nanolitros por minuto pueden limitar la interacción de los analitos con el detector. Por ello, los intentos de mejorar dicha interacción y/o de aumentar la sensibilidad de los detectores es uno de los campos de investigación más activos actualmente en electroforesis capilar. En general, la mayoría de los sistemas de detección mostrados en la Figura V.3 han sido utilizados en ensayos de especiación mediante CE, pudiendo dividirse en dos grandes grupos:

- No específicos: Espectrometría UV-Vis, fluorescencia y algunos detectores electroquímicos, entre otros. En general son detectores que se usan ampliamente en determinaciones electroforéticas clásicas de moléculas orgánicas. Sin embargo, en el campo de la especiación elemental su uso es relativamente limitado debido a las bajas sensibilidades de las señales producidas [5]; además, a menudo requieren una derivatization previa de los analitos, lo que complica el análisis y conlleva cambios en la forma química de los analitos;

- Específicos: Este grupo incluye la espectrofotometría así como los sistemas de detección usados en combinación con CE en las técnicas híbridas, como son: AAS, ICP-OES, ICP-MS y TOF-MS, entre otros.

La hibridación de CE con los sistemas de detección específicos resulta, por un lado, en determinaciones mucho más fiables y, sobre todo, mejora la sensibilidad. Entre dichos sistemas de detección el ICP-MS es el que ha alcanzado más interés por parte de los investigadores. Esto se debe a sus excelentes características analíticas como son la extraordinaria sensibilidad, excelente selectividad, capacidad multielemental, amplio rango dinámico, la posibilidad de medir relaciones isotópicas y la relativa facilidad para manejar y modificar su sistema de introducción de muestras líquidas [12].

V.1.6. Interfases entre CE y los sistemas de detección elemental basados en ICP

Combinar CE con ICP-MS o ICP-OES requiere el uso de una interfase debido a la gran incompatibilidad de los flujos de muestra líquidos a los que trabajan cada una de estas técnicas ($\mu\text{L min}^{-1}$ para CE y mL min^{-1} para ICP-MS). Los sistemas de introducción de muestras líquidas más comunes en ICP consisten en un nebulizador y una cámara de nebulización (Capítulo 2 de esta memoria). Por tanto, la mayoría de las interfases desarrolladas adoptan esta configuración. Los retos en el acoplamiento de CE con los sistemas de detección basados en plasma de acoplamiento inductivo se podrían resumir en los siguientes puntos:

- Obtener suficiente flujo líquido para el correcto funcionamiento del nebulizador y el mantenimiento de un plasma estable;
- Obtener una gran eficiencia de transporte de analito hacia el plasma;
- Mantener la conexión eléctrica entre ambos lados del capilar de separación;
- Preservar el perfil plano del flujo electroosmótico.

Los primeros artículos publicados sobre interfases CE-ICP han aparecido hace aproximadamente 20 años [5]. Desde entonces han sido propuestos múltiples diseños de interfase entre estas técnicas. Todos ellos se podrían dividir en tres grupos: (i) interfases directas, sin flujo líquido auxiliar, en las que el capilar de separación se conecta directamente al nebulizador; (ii) interfases con flujo líquido auxiliar (i.e., “make-up”),

en las que al flujo proveniente de la electroforesis capilar se añade un flujo líquido adicional y; (iii) interfaces basadas en la generación de especies volátiles de los analitos.

V.1.6.1. *Interfaces CE-ICP directas*

Estas interfaces han sido las primeras aproximaciones en la hibridación entre CE y ICP-MS [14]. En este tipo de interfaces el canal de separación forma parte del propio nebulizador, como canal de aporte de muestra líquida (Figura V.5, [14]).

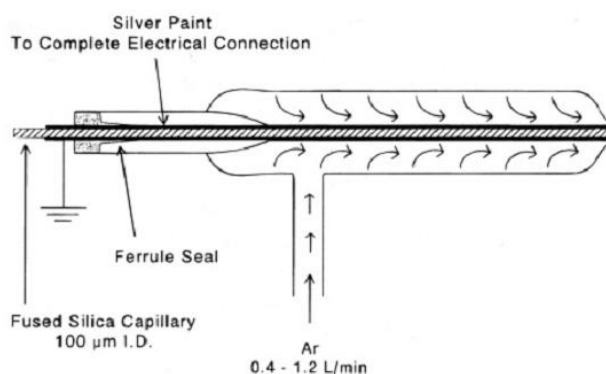


Figura V.5: Esquema de una interfase CE-ICP directa, sin flujo líquido auxiliar [14].

La ventaja fundamental de este tipo de interfase consiste, sobre todo, en su simplicidad ya que no es necesario tener una conexión adicional para un flujo auxiliar. Por otro lado, la necesidad de mantener un diámetro del capilar de separación constante y de realizar la conexión de alto voltaje hace imposible el uso de nebulizadores convencionales. Por tanto, se han desarrollado nebulizadores dedicados. En el dispositivo mostrado en la Figura V.5 el canal líquido de un nebulizador neumático concéntrico ha sido reemplazado por el capilar de separación. El final de éste ha sido pintado con pintura de plata para conseguir la cadena eléctrica entre el reservorio de disolución portadora y la punta del capilar.

Las desventajas más destacadas de este tipo de interfaces son, por un lado, que no ofrecen una solución al problema de incompatibilidad de flujos líquidos y, por otro lado, la interrupción del flujo electroosmótico debido al efecto de succión provocado por el efecto de Venturi en la punta del nebulizador neumático concéntrico.

Es una solución prometedora ya que permitiría conectar fácilmente y de forma directa la técnica de separación con la de detección; sin embargo, esto solo sería posible

si se dispusiese de un nebulizador de alta eficiencia en el cual no existiese el fenómeno de succión debido al efecto Venturi.

V.1.6.2. *Interfases CE-ICP con flujo líquido auxiliar*

Como su nombre indica, en este tipo de interfases al flujo electroosmótico se añade un flujo auxiliar (Figura V.6, [15]). Esto se hace por varias razones. Por un lado, se consigue mejorar el trabajo del nebulizador y así aumentar el transporte de disolvente hacia el plasma con lo que se obtienen unas condiciones de trabajo del ICP cercanos a las óptimas. Por otro lado, la adición del flujo auxiliar debe mitigar (o incluso eliminar) el efecto de succión provocado por el efecto Venturi.

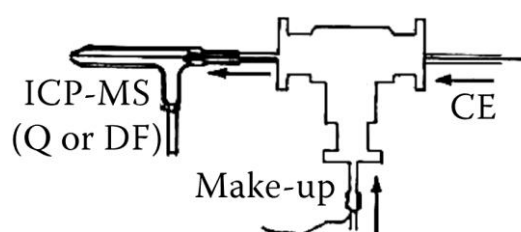


Figura V.6: Interfase CE-ICP con flujo líquido auxiliar[15].

Las ventajas que presentan las interfases con flujo líquido auxiliar han hecho que éstas sean las más usadas en especiación elemental por CE-ICP [3,5,11,12]. Hoy día existen interfases comerciales de este tipo (Figura V.7 [16]) aunque en la mayoría de las publicaciones científicas se emplean diseños caseros [13,17-20].



Figura V.7: Interfase CE-ICP con flujo líquido auxiliar modelo CEI-100 de la casa comercial CETAC Technologies [16].

El flujo auxiliar se puede añadir al flujo electroosmótico mediante un conector cruzado o en forma de T. El mismo conector sirve también para introducir el electrodo de la cadena eléctrica de CE. En la Figura V.8 ([12]) se muestran tres posibles diseños de dicha interfase.

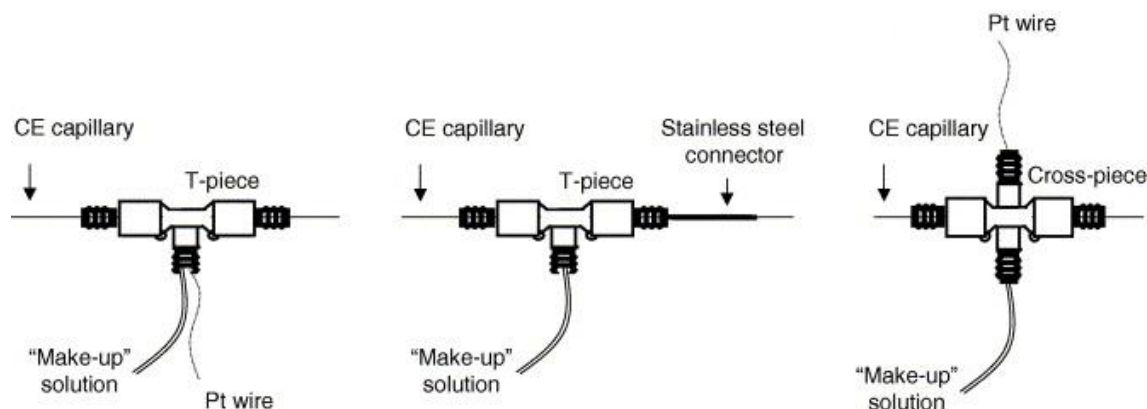


Figura V.8: Diseños típicos de interfases con adición de flujo líquido auxiliar [12].

Cabe destacar que, a diferencia de las interfases directas, la inclusión del conector en los sistemas con flujo líquido adicional crea inevitablemente un volumen muerto entre el capilar de separación y el capilar para el líquido del nebulizador. Dicho volumen muerto tiene un efecto negativo sobre la resolución de la separación electroforética.

El flujo auxiliar se añade al flujo electroosmótico bien mediante bombeo o bien por aspiración libre generada por el propio efecto Venturi en la punta del nebulizador. Como ya se ha comentado anteriormente una de las funciones principales del flujo auxiliar es mitigar o eliminar dicho efecto de succión. Esto se puede conseguir de diversas formas, como son [12]:

- Regulando debidamente el caudal del flujo auxiliar para que éste se ajuste lo mejor posible al flujo requerido por la succión;
- Reducir el flujo de gas de nebulización con el objetivo de obtener una succión menos intensa;
- Ajustar la posición del capilar de separación en la interfase para que la salida de éste se vea menos afectada por la succión del nebulizador;

- Aplicar presión negativa al reservorio de disolución portadora del sistema de electroforesis capilar para compensar así la presión opuesta creada por la succión.

Sin embargo algunas de estas medidas comprometen el óptimo funcionamiento de los componentes del sistema. La segunda propuesta impide el funcionamiento del nebulizador en sus condiciones óptimas, lo que resulta en una reducción en el transporte de aerosol hacia el plasma y, por tanto, en una reducción en la sensibilidad de las señales obtenidas. Por otro lado, la tercera medida influye negativamente en la capacidad de separación del sistema electroforético.

Una manera fácil de compensar los efectos negativos provocados por algunas de las medidas propuestas para reducir el efecto de succión es mediante el uso de micronebulizadores. Los diámetros internos de los capilares líquido y gaseoso son más pequeños que los de los nebulizadores neumáticos convencionales, lo que les hace idóneos para una nebulización eficiente a flujos líquidos y de gas de nebulización reducidos. Esto, por un lado, minimiza el efecto de succión que generan y, por otro aumenta el transporte de aerosol hacia el plasma. Varios micronebulizadores han sido usados como interfase entre CE y las técnicas basadas en plasma entre los cuales se encuentran el HEN[®] [21], el MCN[®] [22] y el Micromist[®] [21,23,24].

A pesar de las ventajas ofrecidas por la facilidad de manejo, la utilización de nebulizadores más eficientes y la existencia de sistemas comerciales el mayor problema de las interfases con flujo líquido adicional consiste en la dilución que experimenta la muestra debido a dicho flujo auxiliar, que en algunos casos puede producir una dilución de la muestra importante. Este hecho deteriora la sensibilidad e impide conseguir menores límites de detección. Por ello, el desarrollo de nuevas y mejores interfases sigue siendo un tema de gran actualidad investigadora.

Recientemente se ha propuesto una interfase mejorada en la cual no se usa un conector en T, con lo que se reduce significativamente el volumen muerto existente entre el capilar de separación y el capilar para el líquido del nebulizador [25] (Figura V.9, [25]). El dispositivo ha sido utilizado con éxito en separaciones de arsénico y estaño en muestras reales [17,26]. Sin embargo, su diseño es relativamente complicado ya que incluye dos bombas peristálticas que deben ser encendidas y apagadas varias veces durante un ensayo, lo hace poco probable su utilización en análisis de rutina.

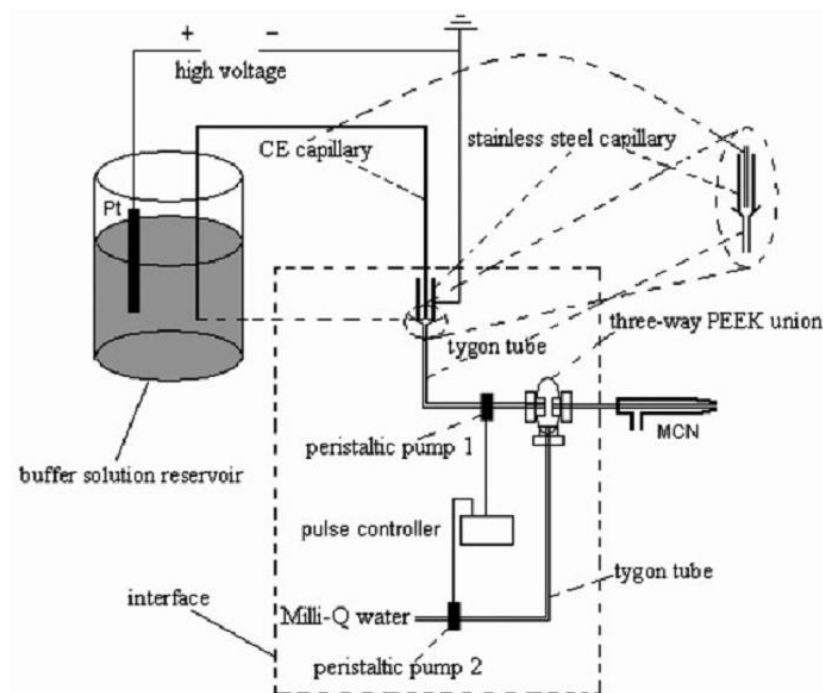


Figura V.9: Esquema del diseño de una nueva interfase CE-ICP [25].

Otra propuesta reciente consiste en usar un nebulizador de consumo ultra bajo y una cámara de nebulización de tamaño reducido para aumentar el transporte de aerosol hasta el plasma [27,28] (Figura V.10, [28]). Este diseño emplea el concepto de “transporte total” del aerosol generado puesto que la cámara de nebulización carece de salida para el drenaje.

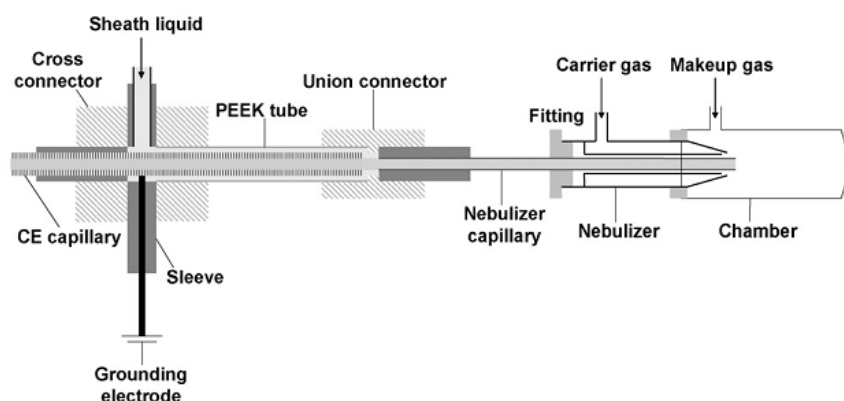


Figura V.10: Interfase CE-ICP con nebulizador de consumo ultra bajo y cámara de nebulización de tamaño reducido [28].

V.1.6.3. *Interfases CE-ICP basadas en la generación de especies volátiles*

La conversión de las especies separadas mediante CE en formas volátiles de las mismas se podría considerar la solución “ideal” para la hibridización de CE con ICP. Esto es debido a que, en teoría, esta aproximación carece de los problemas de la incompatibilidad de flujos entre las dos técnicas, por lo que ambas pueden funcionar en sus condiciones óptimas.

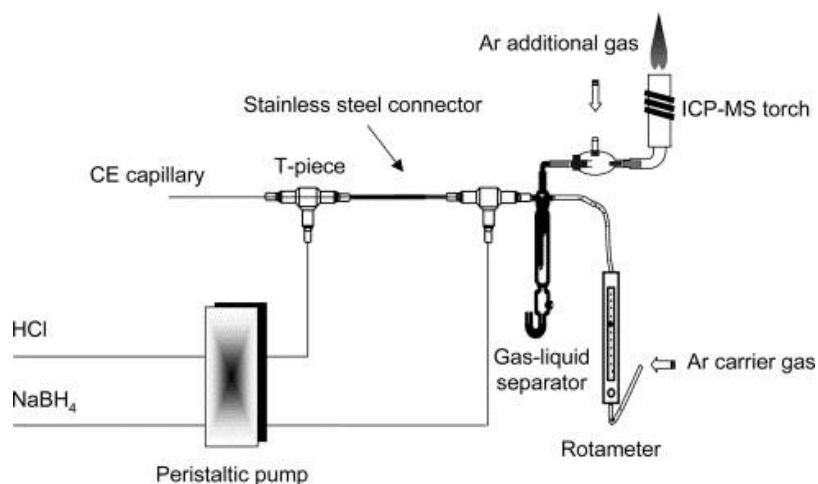


Figura V.11: Diseño de una interfase CE-ICP basada en generación de especies volátiles [29].

En la Figura V.11 ([29]) se muestra el esquema de una interfase basada en la generación de especies volátiles. Los reactivos necesarios para la generación de las formas gaseosas de los analitos (disolución ácida y borohidruro sódico) se añaden de forma consecutiva después del final del capilar de separación mediante dos conectores en forma de T. La reacción de formación de las especies volátiles ocurre en un separador gas-líquido, desde el cual, los analitos, en forma de una especie volátil son arrastrados por un flujo de argón hasta el ICP.

Las ventajas que presentan las interfases basadas en la generación de especies volátiles son [3,12]:

- La eficiencia de transporte del analito hasta el plasma es muy alta (cerca de 100%);
- Los analitos son introducidos en el plasma en forma homogénea gaseosa, lo que favorece los procesos en el plasma;

- Los efectos de matriz son mucho menores que con los sistemas basados en nebulización ya que solo los componentes volátiles llegan al plasma;
- El sistema electroforético funciona en sus condiciones óptimas y el flujo electroosmótico no está interrumpido por efecto de succión.

Comparaciones hechas entre interfases CE-ICP basadas en nebulización y en generación de especies volátiles han confirmado las ventajas en sensibilidad y límites de detección (hasta cuatro veces más bajos) obtenidas con éstas últimas [30].

Un problema encontrado durante el desarrollo de interfases basadas en generación de especies volátiles es la excesiva formación de gas hidrógeno dentro del sistema lo que provoca una sobrepresión dentro del capilar de separación y dificulta el flujo electroosmótico. Sin embargo, la mayor desventaja de este tipo de interfases es su escasa aplicabilidad ya que, hasta el momento, solo han sido utilizadas con unos pocos elementos como mercurio [30], arsénico [31] y cadmio [29].

V.2. Objetivos y plan de trabajo

V.2.1. Objetivo

Considerando los avances recientes en el desarrollo de interfases que permiten el acoplamiento entre la electroforesis capilar y la espectrometría atómica basada en plasma de acoplamiento inductivo y las posibilidades ofrecidas por la tecnología de nebulización “Flow Focusing”[®] se ha propuesto como objetivo general del trabajo experimental de este capítulo:

Investigar nuevas formas de acoplamiento entre técnicas de separación, basadas en sistemas electroforéticos, y de determinación elemental, basadas en ICP-OES e ICP-MS, mediante el diseño y la construcción de un nuevo dispositivo que integra la separación electroforética y la etapa de nebulización, ésta última basada en la tecnología “Flow Focusing”[®].

V.2.2. Plan de trabajo

El plan de trabajo desarrollado en la presente investigación ha constado de los siguientes apartados:

- Diseño, construcción y ensamblaje de los distintos componentes de la interfase (compartimento de electrolito, válvula de inyección, capilar de separación, nebulizador dedicado, cámara de nebulización dedicada);
- Optimización de las variables de separación y de nebulización con el fin de conseguir el balance necesario para la separación de los analitos y su transporte hacia el plasma;
- Caracterización del rendimiento analítico del sistema (obtención de las características analíticas) para la especiación de Cr (Cr(III)/Cr(VI)) mediante ICP-OES e ICP-MS.

V.3. Resultados experimentales: Elemental speciation by capillary electrophoresis with inductively coupled plasma spectrometry: enhancement by Flow Focusing[®] nebulization

V.3.1. Introduction

Trace elements toxicity often depends on their chemical form. Therefore, there is ever growing need of analytical methodologies for determination of different chemical forms of the same element – speciation analysis [1]. Chromatographic techniques coupled to element detector are often the tools of choice for this kind of analysis. However, Capillary Electrophoresis (CE) is a powerful tool in element speciation because of its high separation capabilities, environmentally friendly nature and extremely low reagent/sample consumption [3,11,12]. The latter, however, presents an important problem when CE is coupled to Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (ICP-OES) or Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) due to liquid flow incompatibility (typically one order of magnitude lower in CE than in ICP sample introduction systems). In the last 20 years, numerous approaches for overcoming this incompatibility have been proposed, applied to model and real samples. Most of these rely on addition of make-up flow prior the nebulizer, aiming to deliver enough liquid for the nebulizer to function correctly and to compensate the suction effect of the nebulizer on the separation capillary, which disturbs the electro-osmotic flow [32-34]. Micronebulizers [21,24,35] are often applied and direct injection nebulizers applications have also been reported [36]. Another approach consists in the generation of volatile forms by derivatization of the analytes [31,37,38]. Hyphenations of ICP-MS with CE microfluidic devices have also been reported [39,40]. Most of the published reports have been recently reviewed by Alvarez-Llamas et al and [12] Michalke et al [41]. Commercial systems based on some of the abovementioned approached are nowadays offered by various leading manufacturers.

Despite these advances in CE-ICP coupling, the analyte quantities introduced in the plasma after CE separation are still much lower than the ones achieved by using other separation techniques (e.g., chromatography, on-line solid phase extraction, etc.). Thus,

analytical sensitivities with this combination tend to be lower and the obtained detection limits tend to be higher [3,12]. This and the relatively long analysis times, make CE-ICP combination unattractive for routine element speciation analysis. In order to overcome the sensitivity drawback, off-line (such as solid or liquid phase microextraction) and in-line (such as sample stacking in different modes) preconcentration techniques have been proposed. These techniques have been recently reviewed by A. Timerbaev [3].

In this work, a novel approach for electrophoretic separation and ICP sample introduction is presented. In contrast to the typical CE that relies on electroosmosis to generate carrier/sample flow, the proposed system uses pneumatically generated liquid flow for carrier transport and sample injection, aiming to increase the analyte quantity reaching the plasma and, thus, to lower the detection limits. Moreover, the system incorporates a dedicated Flow-Focusing[®] (FF) based micronebulization unit for improving nebulization efficiency at low sample uptakes. Flow Focusing[®] [42] nebulization principle has already been applied to the construction of conventional and micro nebulizers that have shown excellent nebulization efficiency, especially at low sample uptakes [43,44]. However, the use of pneumatically driven flow could lead to a decrease in resolution due to its laminar nature.

Therefore, the purpose of this work was to study the viability of the approach proposed as a first step to a future development of a dedicated devices for simplified routine sample speciation analysis. To this end, a prototype of Capillary Electrophoresis Flow Focusing[®] Nebulization System (CEFFS) has been constructed and optimised for separation and ICP-based detection of Cr(III) and (CrVI) in model samples. The approach viability has been tested in both ICP-OES and ICP-MS.

V.3.2. Experimental

V.3.2.1. Instrumentation

A scheme of the system prototype used in this work, including some component photographs, is presented in Figure V.12. It consists of the following main components: home-made carrier electrolyte module (a), 10 port selection valve (model 7610-600, Rheodyne Rohnert Park, CA, USA) (b), 0.75 mm i.d. fused silica separation capillary (Supelco Analytical, Bellefonte, PA, USA) (c), dedicated Flow Focussing[®] nebulizer

(home-made prototype) (d) and a high voltage power supply (model Brandenburg 707R, Applied Kilovolts Ltd., Worthing, UK) (e).

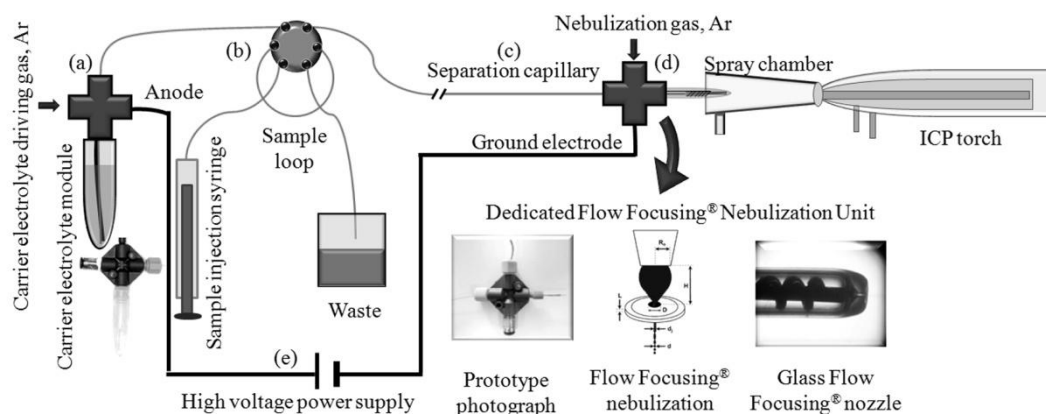


Figure V.12: Scheme of the system prototype and photograph of some system components.

The home-made carrier electrolyte module (a) (component photography on Figure V.12) is built around a PEEK cross connector. On one side of this connector a 1.5 mL conical vial (agglutinated to an appropriate fitting) is screwed; it contains the carrier electrolyte. On the opposite side another fitting is screwed, that holds a fused silica capillary which extends through the cross connector and enters until the bottom of the vial. A third cross connection is used to fit a gas inlet for carrier electrolyte driving. To the fourth one (i.e., the opposite to the gas inlet) a fitting that holds a Pt wire is screwed. This Pt wire also extends through the cross connector and enters to the bottom of the conical vial; it serves as an electrode for the CE separation. As already mentioned, the system prototype constructed in this study uses pressure to generate the carrier electrolyte flow, in contrast to the conventional CE systems, which use electroosmosis. Pressurized argon is supplied by the gas inlet of the cross connection to push the carrier electrolyte through the fused silica capillary all the way to the dedicated FF nebulizer.

The sample is injected in the carrier stream by a selection valve (b). It is first introduced in a loop by a syringe and then, by rotating the valve, into the separation capillary. The amount of injected sample is not controlled by the loop volume but by the time the valve was in injection position and hence, not all the loop volume is injected. The loop serves only as a simple mean for performing consecutive introduction of samples and standards with different concentrations.

The home-made FF nebulizer (d) (component photography in Figure V.12) serves as both a mean to close the CE electric circuit and to nebulize the sample after analytes separation. It is built around a cross connector (the same type as the one used for the carrier electrolyte module construction). On one of its sides, a glass tube is fastened by an appropriate fitting. The other end of this glass tube was previously flame shaped in order to obtain a 100 μm diameter nebulizer exit orifice (component photography in Figure V.12). The end of the CE separation fused silica capillary is connected to a 75 μm i.d. Pt tube using a shrink tubing (the ends of the Pt tube and the capillary tube were previously polished in order to obtain minimum dead volume). This assembly is fixed to the cross connector by a fitting on the opposite side to the glass tube. The Pt tube extends through the connector, and enters into the glass tube on the other side. Through the third side of the cross connector a Pt wire (connected to the high voltage power supply) is passed, entering also into the glass tube. This Pt wire is coiled around the Pt tube at the end of the CE capillary. It serves as an electrode for CE separation and also to fix axially the Pt tube relative to the moulded orifice at the end of the glass tube. The Pt tube is then positioned at 60 μm distance from the glass tube orifice, forming this way the FF nebulization nozzle (component photography in Figure V.12). The distance between the Pt tube exit and the nebulizer's orifice is regulated with the two screw fittings supporting the glass tube and the CE capillary, respectively, to the cross fitting. A gas fitting is connected to the last side of the cross connector in order to provide the Ar nebulizer gas flow inside the glass tube, to the nebulizer nozzle. Glass tubes have already been used for construction nebulization nozzles based on the Flow Focusing[®] principle [45]. However, to the authors' knowledge, this is the first time such procedure and material are applied for the construction of a FF nebulizer for sample introduction in ICP.

The electrophoretic separation through the CE capillary was driven by a Brandenburg 707R high-voltage dc power supply which can be operated in a voltage-controlled (15 kV maximum) mode. Electrical connections between the power supply and the electrolytes were maintained using platinum electrodes. The electrode at the carrier electrolyte module (a) was held at a positive potential while the one at the nebulizer tip end was grounded.

A dual-view ICP-OES model Optima 4300DV (PekinElmer, Norwalk, CT, USA) was used for system development and optimisation. The spectrometer's software does

not allow sampling of transient signals. Therefore, for acquisition of each electropherogram, a single run of 300 replicates was measured at 0.1 sec integration time (0.4 sec read time). These acquisition parameters, limited by the ICP-OES instrumentation used, were not the optimal for this kind of measurements and thus led to high baseline noise, which unfavorable for the detection limits. Therefore in addition to the ICP-OES test, the CEFF system was also shortly tested with an ICP-MS model 7700 (Agilent Inc., Tokyo, Japan) allowing for better transient signals measurements. Both spectrometers' operating conditions, optimised for working with the CEFF system, are shown in Table V.2.

The CEFF prototype tested in this research works at very low liquid flows (around $7 \pm 1 \mu\text{L min}^{-1}$). Thus, a dedicated spray chamber was used with the ICP-OES spectrometer to ensure maximum aerosol transport to the plasma, for increasing emission signal, and to minimise the aerosol transport time for decreasing peaks' diffusion caused by mixing of slow moving aerosols. A single pass design with approximately 10 mm i.d. at the nebulizer side, 50 mm length and approximately 3.5 mL volume was constructed. During operation, no need for liquid draining from the chamber was observed, which could be due to both the high quality of the aerosols produced with the Flow Focussing[®] nebulizer and the low liquid flow rate. With the ICP-MS, the spectrometer's commercial double pass Scott type spray chamber was used, due to the impossibility to fit the dedicated spray chamber into the spectrometer's Peltier cooling jacket.

Table V.2: ICP-OES and ICP-MS working conditions, optimized for use with CEFFS.

ICP OES (Perkin-Elmer 4300DV)		ICP-MS (Agilent 7700)	
Ar flows, L min ⁻¹	Plasma: 15 Auxiliary: 0.2 Nebulizer: 0.7	Ar flows, L min ⁻¹	Plasma: 15 Auxiliary: 0.2 Nebulizer: 0.7 Carrier: 0.2
RF power, W	1300	RF power, W _r	1250
Viewing mode	Axial	Dwell time, sec	0.2
Integration time / Read time, sec	0.1- / 0.4	Run time, sec	300
Points acquired	300	Isotopes	⁵² Cr, ⁵³ Cr
Emission line	Cr II (267.716 nm)		

V.3.2.2. Reagents

Ultrapure water (18.3 MΩ cm) and appropriately diluted high-pure nitric acid (65% Suprapur[®], Merck, Darmstadt, Germany) were used for preparing all the reagents. Stock

solutions of Cr(III) and Cr(VI) were prepared by diluting analytical-grade $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$ and $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, respectively (Panreac, Barcelona, Spain), in order to obtain standard solutions containing two Cr species: Cr(III) as a cation (Cr^{3+}) and Cr(VI) as an anion (HCrO_4^-) (more information is included in the ESM).

V.3.2.3. *Procedure*

Optimised electrophoretic separation conditions used with CEFFS are listed in Table V.3. The following protocol was established for Cr speciation:

- A controlled pressure (1.5 bar) is applied to the gas inlet of the carrier electrolyte module in order to obtain a stable flow through the separation capillary to the nebulizer.
- The sample is introduced into the sample loop of the injection valve by means of a plastic syringe.
- The valve is rotated to “inject” position for an optimised period of time (3 sec). At this point, a portion of the sample is injected into the separation capillary.
- The valve is rotated back to “load” position and the separation potential (15 kV) is applied between the injection module and the nebulizer nozzle.
- The signal from Cr is registered with the relevant ICP spectrometer in a continuous mode (acquisition conditions in Table V.2).
- After the separation takes place, the high voltage power supply is turned off, the valve is rotated to “inject” position and rinsed with 0.5 mL of electrolyte in order to prevent occurrence of memory effect between samples.
- After the electrolyte inside the carrier module is consumed, the module is unscrewed, refilled and screwed back. This can be done with the plasma ignited or extinguished, depending on the spectrometer used.

V.3.2.4. *Safety Considerations*

The high-voltage could provoke electrical shock. In this research, prototypes with open electrodes and circuits have been used. Such experimental setups should be, and have been, handled with extreme care in order to avoid health risks.

Table V.3: Optimum electrophoretic separation conditions used with CEFFS.

Parameter	Value
Separation capillary length	1 m
Carrier flow generation pressure	1.5 bar
Carrier flow	$7 \pm 1 \mu\text{L min}^{-1}$
Carrier electrolyte concentration	15 mM, HNO_3
Sample injection time	3 sec
Separation potential	15 kV

V.3.3. Results and discussion

V.3.3.1. Proof of concept

Figure V.13A shows the ICP-OES signals obtained for various consecutive injections of a standard solution containing equal concentration (i.e., 10 mg L^{-1}) of Cr(III) and Cr(VI), when increasing the applied separation potential from 0 (electropherogram 1 in the figure) to 15 kV (electropherogram 6). As can be observed, two peaks start to appear at a separation potential of 12 kV (electropherogram 4) indicating a possible separation of the two Cr species. When further increasing the separation potential, the resolution is improved (electropherograms 5 and 6).

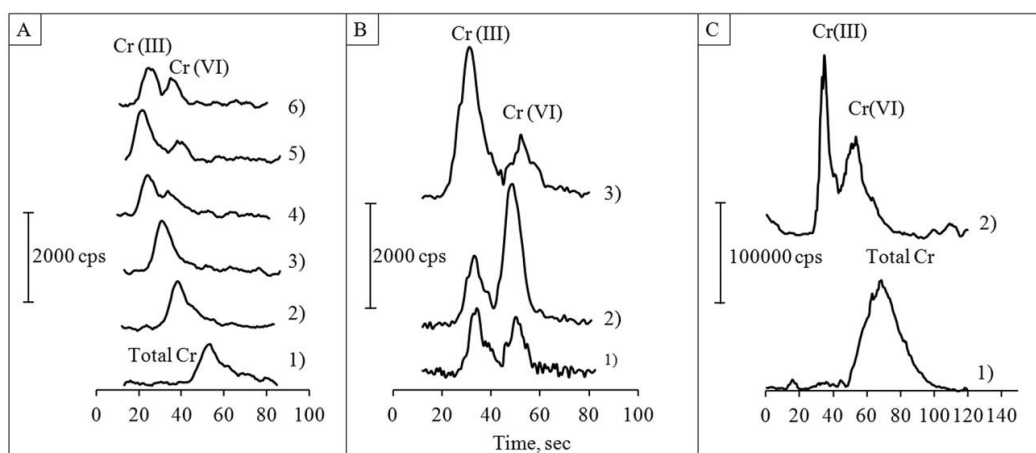


Figure V.13: Proof of concept for the strategy applied in this study. A: Injections in ICP-OES; sample Cr(III) and Cr(VI) 10 mg L^{-1} each; carrier electrolyte 15 mM HNO_3 ; injection time 3 sec; separation potential 1) 0 V, 2) 4 kV, 3) 8 kV, 4) 12 kV, 5) 14 kV, 6) 15 kV. B: Injections in ICP-OES; carrier electrolyte 15 mM HNO_3 ; injection time 3 sec; separation potential 15 kV; samples 1) Cr(III):Cr(VI) = 1:1, 2) Cr(III):Cr(VI) = 1:3, 3) Cr(III):Cr(VI) = 3:1. C: Injections in ICP-MS; sample Cr(III) and Cr(VI) $10 \mu\text{g L}^{-1}$ each; carrier electrolyte 15 mM HNO_3 ; injection time 3 sec; separation potential 1) 0 V, 2) 15 kV.

In order to prove the origin of the two peaks, three samples with different Cr(III)/Cr(VI) concentration ratios were analysed. The results of this test, shown in Figure V.13B, suggest that the first peak corresponds to Cr(III) and the second one corresponds to the Cr(VI) specie. This was the expected result, taking into account the polarities of the species (i.e., cation for Cr(III) and anion for Cr(VI)) and the separation potential applied (i.e., anode to the carrier electrolyte module and ground to the nebulization nozzle).

Figure V.13C presents two consecutive sample injections of a standard solution having equal concentrations ($10 \mu\text{g L}^{-1}$) of Cr(III) and Cr(VI) in ICP-MS. The first injection (electropherogram 1) was performed without separation potential application and the second one (electropherogram 2) with 15 kV separation potential application. As in the case of ICP-OES, two separate peaks corresponding to Cr(III) and Cr(VI), respectively, were registered when 15 kV voltage was applied, while only one peak corresponding to total Cr content was recorded when no separation voltage is applied. This test proved the concept's viability in another ICP-based spectrometric technique. Moreover, in this case the analytes' concentration in the model sample was three orders of magnitude lower than in ICP-OES (i.e., $10 \mu\text{g L}^{-1}$ vs. 10mg L^{-1}) showing, as expected, the clear sensitivity advantage of ICP-MS against ICP-OES.

V.3.3.2. *Pressure-induced and electroosmotic carrier electrolyte flow*

The Flow Focussing[®] nebulization principle is known to cause high pressure at the exit of the liquid capillary, in contrary to most of the the conventional nebulizers used for sample introduction in ICP, which have low pressure at this point due to Venturi effect. This is why, with the prototype described, low carrier electrolyte flows are obtained using relatively high carrier flow generation gas pressures (around 1.5 bar for obtaining approximately $7 \mu\text{L min}^{-1}$). The high pressure at the exit of the liquid capillary of the FF nebulizer cannot be efficiently compensated by solely the electroosmotic flow, and therefore it pushes the carrier electrolyte upstream (i.e., in the direction opposite to the nebulizer nozzle) and drains the system. For this reason, the CEFF system design was based on a pressure driven carrier flow to compensate for the FF nebulizer high pressure. It is worth mentioning here, however, that this approach has some inherent

advantages, such as the possibility to use higher flows than the purely electroosmotically generated ones, which is beneficial for the analytical sensitivity as already mentioned, and the possibility to determine total analyte content by simply not applying separation potential to the system.

A decrease in the peaks' migration times is observed when increasing the separation potential (see electropherograms in Figure V.13A). This behaviour is typical for the conventional CE systems based on electroosmotic flow. Therefore, it can be inferred that even if this research prototype uses pressure for inducing the carrier flow, electroosmotic flow probably occurs also when high voltage is applied in the separation capillary, which could explain migration times' behaviour.

V.3.3.3. *Electrophoretic separation parameters study and optimisation*

The choice of the CEFFS configuration and its operation conditions was done after some theoretical considerations and optimisation studies. The following parameters were taken into account: separation capillary length, carrier flow generation pressure, carrier electrolyte concentration, sample injection time and separation potential. The optimised operation conditions used in this work are listed in Table V.3. Discussion of the influence of each parameter on the system's performance is given below.

V.3.3.3.1. *Separation capillary length*

Three different capillary lengths (from 1 m to 3 m) were tested, and the results obtained are shown in Figure V.14. Increasing the capillary length leads to a decrease in the peaks' resolution. This is probably due to the lower electrical current (because of the higher electrical resistance) and to the higher diffusion grade due to the parabolic front shape of the pressure-driven carrier flow.

Capillary lengths shorter than 1 m were not tested due to need of a certain minimum distance between the nebulization unit and the selection valve when fitting the CEFFS to the spectrometer.

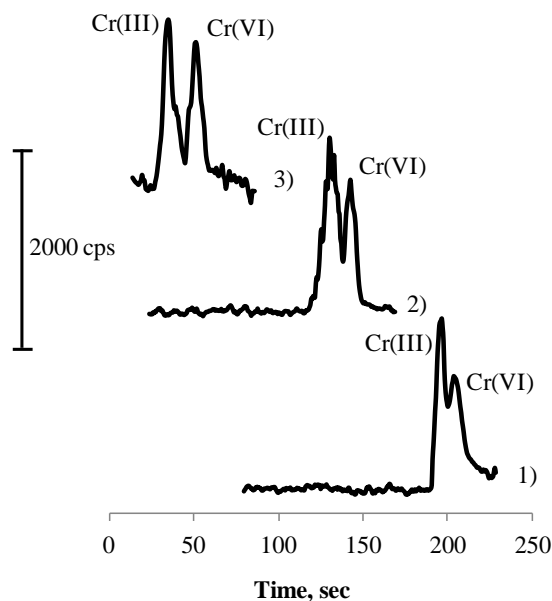


Figure V.14: Influence of the separation capillary length on the Cr species separation. Sample Cr(III) and Cr(VI) 10 mg L^{-1} each; carrier electrolyte 15 mM HNO_3 ; flow generating pressure: 1.5 bar ; injection time 3 sec ; separation potential 15 kV ; separation capillary length: 1) 3 m , 2) 2.5 m , 3) 1 m .

V.3.3.3.2. Carrier flow generation pressure

As already mentioned in the main text of this article, with the Flow Focussing[®] (FF) nebulization principle, there is a zone of high pressure at the tip of the liquid flow capillary of the nebulizer. This pressure extends further upstream through the liquid flow capillary (in the case of CEFFS – the separation capillary). With the conventional FF-based nebulizers for sample introduction in ICP, external pumping system is needed in order to provide constant liquid flow to the nebulization nozzle. Usually, a peristaltic pump is used; however it generates pulsations in nebulization, especially at the low revolutions needed to obtain low liquid flows. In the CEFF prototype, the carrier electrolyte flow is generated by high gas pressure applied in the headspace inside the carrier electrolyte module to overcome the FF nebulizer pressure. This pressure was optimised in order to achieve a stable flow during sample injection and separation, at a rate that provides enough time for the analyte species to separate in the electric field. It was observed that this flow was most stable when the pressure applied is the same as the nebulization gas pressure provided at the nebulization module. Therefore, and in order to maintain the system as simple as possible, a T cross split mounted on the nebulisation gas tube of the spectrometer has been used to divide the flow in two streams for nebulization and carrier flow generation. The nebulizer geometry was tuned

up in order to obtain a nebulization gas flow of 0.7 L min^{-1} with a pressure of around 1.5 bar. This pressure has been found to be sufficient to push the carrier electrolyte through the separation capillary and to obtain Cr species separation when high voltage is applied. The nebulisation gas flow of 0.7 L min^{-1} was chosen according to the authors experience with the Optima 4300 spectrometer as an optimum for maximum aerosol transport rate and plasma stability.

V.3.3.3.3. *Carrier electrolyte concentration*

15 mM HNO_3 solution was used in this work as carrier electrolyte, and the same was also used for preparing standard solutions. It was selected in order to provide a pH around 2.5 that will ensure the presence of Cr(III) as Cr^{3+} cation and of Cr(VI) as HCrO_4^- anion [46]. In real samples analysis, however, the actual pH value of the sample should be taken into account and the carrier electrolyte acidity should be adjusted accordingly in order to prevent changes by oxidation or reduction. Additional ionic strength adjustment might be needed after some optimization studies.

V.3.3.3.4. *Sample injection time*

In CEFFS, the sample is injected into the carrier flow stream by means of an injection valve. The sample is first introduced into a loop, by a syringe, and then into the carrier flow stream by rotating the selection valve. Initially, a loop of a fused silica capillary with the same internal diameter (i.d. $75 \mu\text{m}$) as the separation capillary and a length as short as possible was fitted to the selection valve (approximately 10 cm), and all the loop volume was injected. However, this sample volume was found to be too large for efficient separation. Consequently, loops of lower i.d. ($50 \mu\text{m}$) were fitted and tested. These also proved to be inefficient, provoking a decrease in the carrier electrolyte flow because of the smaller section of the loop capillary. Therefore, it was decided to introduce only a portion of the initially tested loop volume, controlling the exact amount of sample injected by the time the valve is set in “inject” position. This approach gave better results in terms of resolution, even if leading to a slight degradation in precision due to manual operation. Further, the effect of the injection time was studied and results are presented in Figure V.15. On one hand, increasing the injection time from 3 to 5 sec resulted in an increase in the peak high for Cr(III) and

Cr(VI), which is a natural consequence of the higher amount of analyte injected. However, the resolution of the two peaks was found to decrease due to incomplete separation of the analytes. On the other hand, injection times lower than 3 sec resulted in a high decrease in signal precision, since injection time is manually controlled. Therefore, an injection time of 3 sec was chosen as a compromise between signal sensitivity, peaks' resolution and signal precision.

It is worth mentioning that, according to the authors' experience, this approach to sample injection is the highest source of uncertainty with this system prototype, and proper modifications, such as use of proper micro-valve with lower dead volumes, allowing lower loop volumes to be used, are needed in future prototypes construction.

V.3.1.1.1. Separation potential

The influence of the high potential application on the Cr separation is shown in Figure V.13A in the main text of the article. The studies have shown that separation improves when increasing the potential applied. Therefore, the maximum voltage of the power supply (i.e. 15 kV) has been used. The use of even higher separation potential could probably result in better separation, which is why a more powerful power supply should be used in future prototypes construction.

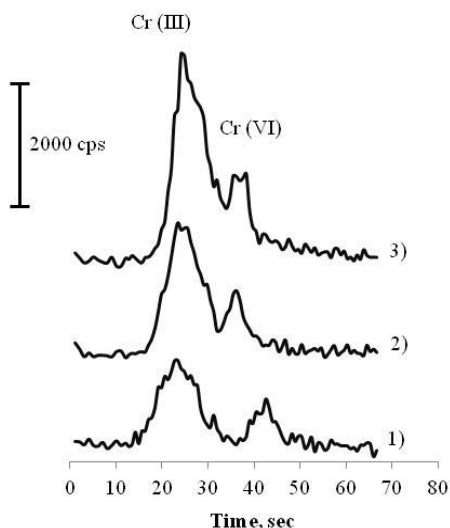


Figure V.15: Influence of sample injection time on the Cr species separation. Sample Cr(III) and Cr(VI) 10 mg L^{-1} each; carrier electrolyte 15 mM HNO_3 ; flow generating pressure: 1.5 bar ; separation potential 14 kV ; injection time: 1) 3 sec., 2) 4 sec., 3) 5 sec.

V.3.1.2. System performance characteristics

System performance was evaluated in both ICP-OES and ICP-MS. The analytical figures of merit obtained (*i.e.*, peak migration times, separation resolution, sensitivity, precision and detection limits) are shown in Table V.4. As observed in Figure V.13, the separation resolution obtained with the CEFF prototype was relatively low in comparison with the typical baseline capillary electrophoretic separation of Cr(III) and Cr(VI) [47]. This can be a consequence of the pressure driven carrier flow. On one hand, this flow is higher than the electroosmotic flows obtained in conventional CE, thus decreasing the time for separation and, consequently, the resolution. On the other hand, the pressure driven laminar flow has a parabolic profile, which increases diffusion and also decreases resolution. Separation resolution could probably be improved by increasing the applied separation potential. In this research, however, the applied separation potential was limited by the maximum voltage delivered by the available power supply. Nevertheless, at the optimum working conditions for Cr separation with the available instrumentation, the two peaks can be considered resolved enough to be used for quantification of the two species in both ICP-OES and ICP-MS). In ICP-MS, the migration times were found to be slightly higher than in ICP-OES, while the peak resolution was slightly lower. This could be possibly due to the double pass spray chamber used with this technique, that increases the aerosol path and, hence, species mixing. The positive side of using pressure driven carrier flow and large sample injection volume can be observed in the sensitivities and, especially, in the excellent detection limits obtained with ICP-MS (see Table V.4).

Table V.4: Analytical figures of merit obtained with the CEFFS in ICP-OES and ICP-MS.

Figure	ICP OES			ICP-MS		
	Cr (III)	Cr(VI)	Total Cr	Cr (III)	Cr(VI)	Total Cr
Migration time, sec ¹	33.4 ± 0.5	50.7 ± 0.6	58 ± 1	34 ± 2	55 ± 2	67 ± 2
Resolution	1.07		--	0.9		--
Sensitivity, cps ppb ⁻¹²	2.55	1,21	1.91	230345	251432	224608
Precision, % ³	10	11	10	13	12	11
LOD, µg L ⁻¹⁴	28	52	38	0.05	0.04	0.03

¹Mean ± standard deviation, n = 3.

²Calculated using peak area.

³Expressed as relative standard deviation %, n = 5.

⁴Limit of detection, based on 3σ of the baseline signal of 10 points.

As expected, analytical sensitivities, measured as peak area, were several orders of magnitude higher in ICP-MS than in ICP-OES, while the detection limits (calculated using the standard deviation of the blank signal) were about three orders of magnitude lower. The unsatisfactory results obtained with ICP-OES could be attributed, on one hand, to the sub-optimal signal acquisition conditions allowed by the spectrometer acquisition software, which lead to very high baseline noise levels (see explanation in *Instrumentation* section) and, on the other hand, to the inherent low sensitivity obtained with the instrument used in this work, even if working at optimal sample introduction conditions. In addition, the excellent results obtained in ICP-MS also suggest the problem in ICP-OES to be attributed to the spectrometer rather than to the CEFFS).

In both techniques, similar precision (RSD%) was observed. No significant differences in precision were observed between total Cr determination (without separation potential) and Cr speciation determination (with 15 kV applied). This leads to the conclusion that the separation procedure by itself does not influence precision. Based on the daily work experience, the authors consider the major source of uncertainty to be the manual sample injection.

A comparison with other recently published CE methods for Cr speciation is given in Table V.5. As already mentioned, the inherent benefits of the approach described in this work leads to lower detection limits, without the need of a preconcentration step, and to shorter analysis time in comparison with the conventional CE techniques. When coupled to ICP-MS, the CEFFS delivers detection limits between 1 and 2 orders of magnitude lower in comparison with previously reported works. However, detection limits in ICP-OES were found to be one order of magnitude higher than other published data [48], probably due to the abovementioned ICP-OES instrumental problems.

Table V.5: Comparison of the approach described in this work with other CE-ICP spectrometry couplings reported.

Description	Total run time, sec	LOD, $\mu\text{g L}^{-1}$			Reference	
		Cr(III)	Cr(VI)	Total Cr		
This work	ICP-OES	≈ 80	28	52	38	-
	ICP-MS	≈ 120	0.05	0.04	0.03	
Short column CE-ICP-MS	≈ 60	1.8	1.9	-	[47]	
CE-DRC-ICP-MS; derivatization of Cr(III) to Cr(III)-DTPA ²⁻	≈ 140	1.3	0.4	-	[49]	
Flow injection with CE-ICP-MS; derivatization of Cr(III) to Cr(III)-DTPA ²⁻	≈ 140	8	6	-	[34]	
CE-ICP-OES with home-made prototype interface	≈ 500	1.5	1.8	-	[48]	

V.3.2. Conclusions

In view of the results exposed above, it could be concluded that the proposed approach for metal speciation by CE coupled to ICP based spectrometry has been successfully applied to Cr separation in liquid samples with ICP-OES and ICP-MS detection. The analytical figures of merit obtained show high potential for analytical applications of the system, with possible advantages in sensitivity and analysis time in comparison with other recently proposed methods. The results obtained in this feasibility study should be seen as a first step to a possible development of dedicated equipment for routine speciation of metal species by plasma-based spectrometric techniques. To this end, however, the prototype used in this work should be further improved in order to obtain better analytical performance, especially regarding peak resolution capability, and precision.

V.4. Referencias

- [1]. D.M. Templeton, F. Ariese, R. Cornelis, L.-G. Danielsson, H. Muntau, H.P.v. Leeuwen y R. Lobinski, *Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches (IUPAC Recommendations 2000)*, Pure Appl. Chem., 2000, **72**, 1453.
- [2]. R. Cornelis (ed.), *Handbook of elemental speciation: Techniques and methodology*, John Wiley and Sons Ltd., 2003.
- [3]. A.R. Timerbaev, *Element speciation analysis using capillary electrophoresis: twenty years of development and applications*, Chem. Rev., 2013, **113**, 778.
- [4]. J.R. Baena, *Los fullerenos y derivados en el ámbito de la especiación medioambiental*, Departamento de Química Analítica y Ecología, Universidad de Córdoba, 2001.
- [5]. I. Ali y H.Y. Abdoul-Enein, *Instrumental Methods in Metal Ion Speciation*, Taylor and Francis Inc., 2006.
- [6]. K. Neubauer, *Innovations in speciation analysis using HPLC with ICP-MS detection*, Advanstar Communications Inc., 2008.
- [7]. B. Michalke, *Perspective on element speciation*, J. Environ. Monit., 2009, **11**, 1754.
- [8]. M. Popp, S. Hann y G. Koellensperger, *Environmental application of elemental speciation analysis based on liquid or gas chromatography hyphenated to inductively coupled plasma mass spectrometry: A review*, Anal. Chim. Acta, 2010, **668**, 114.
- [9]. A. Timerbaev, *Element speciation analysis by capillary electrophoresis: what are the hints on becoming a standard analytical methodology?*, Anal. Chim. Acta, 2001, **433**, 165.
- [10]. <http://www.chem.agilent.com/Library/brochures/5991-1511EN.pdf>, Agilent Technologies, 2013.
- [11]. C. B'Hymer, "CE: ICP/MS", en "Encyclopedia of Chromatography (3rd Edition)", J. Cazes (ed.), CRC Press, 2010, vol. 1, p. 353.

- [12]. G. Álvarez-Llamas, M.R. Fernández y A. Sanz-Medel, *ICP-MS for specific detection in capillary electrophoresis*, Trends Anal. Chem., 2005, **24**, 28.
- [13]. S. Topin, J. Aupiais, N. Baglan, T. Vercouter, P. Vitorge y P. Moisy, *Trace metal speciation by capillary electrophoresis hyphenated to inductively coupled plasma mass spectrometry: Sulfate and chloride complexes of Np(V) and Pu(V)*, Anal. Chem., 2009, **81**, 5354.
- [14]. J.W. Olesik, J.A. Kinzer y S.V. Olesik, *Capillary electrophoresis inductively coupled plasma spectrometry for rapid elemental speciation*, Anal. Chem., 1995, **67**, 1.
- [15]. M. Silva da Rocha, A.B. Soldado, E. Blanco-González y A. Sanz-Medel, *Speciation of mercury compounds by capillary electrophoresis coupled on-line with quadrupole and double-focusing inductively coupled plasma mass spectrometry*, J. Anal. At. Spectrom., 2000, **15**, 513.
- [16]. http://www.cetac.com/nebulizers/cei_100.asp, CETAC Inc., 2013.
- [17]. G.D. Yang, J.H. Xu, L.J. Xu, G.N. Chen y F.F. Fu, *Analysis of ultratrace triorganotin compounds in aquatic organisms by using capillary electrophoresis-inductively coupled plasma mass spectrometry*, Talanta, 2010, **80**, 1913.
- [18]. S. Topin, J. Aupiais y N. Baglan, *Determination of the stability constants of nitrate complexes of Np(V) and Pu(V) using CE-ICP-MS*, Radiochim. Acta, 2010, **98**, 71.
- [19]. J. Petit, J. Aupiais, S. Topin, V. Geertsen, C. Beaucaire y M. Stambouli, *Stability constants determination of successive metal complexes by hyphenated CE-ICPMS*, Electrophoresis, 2010, **31**, 355.
- [20]. M.-W. Hsieh, C.-L. Liu, J.-H. Chen y S.-J. Jiang, *Speciation analysis of arsenic and selenium compounds by CE-dynamic reaction cell-ICP-MS*, Electrophoresis, 2010, **31**, 2272.
- [21]. G. Álvarez-Llamas, M.R. Fernández, M.L. Fernández y A. Sanz-Medel, *Comparison of two CE-ICP-MS interfaces based on microflow nebulizers: application to cadmium speciation in metallothioneins using quadrupole and double focusing mass analyzers*, J. Anal. At. Spectrom., 2002, **17**, 655.
- [22]. Q. Tu, J. Qvarnstrom y W. Frech, *Determination of mercury species by capillary zone electrophoresis-inductively coupled plasma mass spectrometry: a*

- comparison of two spray chamber-nebulizer combinations*, *Analyst*, 2000, **125**, 705.
- [23]. C. B'Hymar, J.A. Day y J.A. Caruso, *Evaluation of a microconcentric nebulizer and its suction effect in a capillary electrophoresis interface with inductively coupled plasma mass spectrometry*, *Appl. Spectrosc.*, 2000, **54**, 1040.
- [24]. E.G. Yanes y N.J. Miller-Ihli, *Characterization of microconcentric nebulizer uptake rates for capillary electrophoresis inductively coupled plasma mass spectrometry*, *Spectrochim. Acta, Part B*, 2003, **58B**, 949.
- [25]. G.D. Yang, X.-Q. Xu, W. Wang, L.-J. Xu, G.-N. Chen y F.-F. Fu, *A new interface used to couple capillary electrophoresis with inductively coupled plasma mass spectrometry for speciation analysis*, *Electrophoresis*, 2008, **29**, 2862.
- [26]. G.D. Yang, J.H. Xu, J.P. Zheng, X.Q. Xu, W. Wang, L.J. Xu, G.N. Chen y F.F. Fu, *Speciation analysis of arsenic in Mya arenaria Linnaeus and Shrimp with capillary electrophoresis-inductively coupled plasma mass spectrometry*, *Talanta*, 2009, **78**, 471.
- [27]. S.-I. Fujii, K. Inagaki, K. Chiba y A. Takatsu, *Quantification of phosphorus in DNA using capillary electrophoresis hyphenated with inductively coupled plasma mass spectrometry*, *J. Chromatogr. A*, 2010, **1217**, 7921.
- [28]. S.-I. Fujii, K. Inagaki, A. Takatsu, T. Yarita y K. Chiba, *Determination of phosphorus using capillary electrophoresis and micro-high-performance liquid chromatography hyphenated with inductively coupled plasma mass spectrometry for the quantification of nucleotides*, *J. Chromatogr. A*, 2009, **1216**, 7488.
- [29]. G. Álvarez-Llamas, M.R. Fernández de la Campa y A. Sanz-Medel, *An alternative interface for CE-ICP-MS cadmium speciation in metallothioneins based on volatile species generation*, *Anal. Chim. Acta*, 2005, **546**, 236.
- [30]. M. Silva da Rocha, A.B. Soldado, E. Blanco-González y A. Sanz-Medel, *Speciation of mercury using capillary electrophoresis coupled to volatile species generation-inductively coupled plasma mass spectrometry*, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2001, **16**, 951.
- [31]. D.D. Richardson, S.S. Kannamkumarath, R.G. Wuilloud y J.A. Caruso, *Hydride Generation Interface for Speciation Analysis Coupling Capillary Electrophoresis to Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*, *Anal. Chem.*, 2004, **76**, 7137.

- [32]. A.F. Lavorante, M.F. Gine, A.P.G. Gervasio, C.E.S. Miranda, M.F. Fiore, C.M. Bellato y E. Carrilho, *Identification of a metallothionein in Synechococcus by capillary electrophoresis hyphenated with inductively coupled plasma mass spectrometry*, Anal. Sci., 2003, **19**, 1611.
- [33]. N. Baglan, A. Delorme y J. Aupiais, *Interface development for coupling capillary electrophoresis (CE) and inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS). Application to plutonium speciation*, AIP Conf. Proc., 2003, **673**, 393.
- [34]. M.F. Gine, A.P.G. Gervasio, A.F. Lavorante, C.E.S. Miranda y E. Carrilho, *Interfacing flow injection with capillary electrophoresis and inductively coupled plasma mass spectrometry for Cr speciation in water samples*, J. Anal. At. Spectrom., 2002, **17**, 736.
- [35]. E.G. Yanes y N.J. Miller-Ihli, *Use of a parallel path nebulizer for capillary-based microseparation techniques coupled with an inductively coupled plasma mass spectrometer for speciation measurements*, Spectrochim. Acta, Part B, 2004, **59B**, 883.
- [36]. L. Bendahl, B. Gammelgaard, O. Jons, O. Farver y S.H. Hansen, *Interfacing capillary electrophoresis with inductively coupled plasma mass spectrometry by direct injection nebulization for selenium speciation*, J. Anal. At. Spectrom., 2001, **16**, 38.
- [37]. B. Deng, J. Feng y J. Meng, *Speciation of inorganic selenium using capillary electrophoresis-inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry with on-line hydride generation*, Anal. Chim. Acta, 2007, **583**, 92.
- [38]. C.A. Suarez y M.F. Gine, *A reactor/phase separator coupling capillary electrophoresis to hydride generation and inductively coupled plasma optical emission spectrometry (CE-HG-ICP OES) for arsenic speciation*, J. Anal. At. Spectrom., 2005, **20**, 1395.
- [39]. Q.J. Song, G.M. Greenway y T. McCreedy, *Interfacing a microfluidic electrophoresis chip with inductively coupled plasma mass spectrometry for rapid elemental speciation*, J. Anal. At. Spectrom., 2004, **19**, 883.
- [40]. Q.J. Song, G.M. Greenway y T. McCreedy, *Interfacing microchip capillary electrophoresis with inductively coupled plasma mass spectrometry for chromium speciation*, J. Anal. At. Spectrom., 2003, **18**, 1.

- [41]. B. Michalke, *Capillary electrophoresis-inductively coupled plasma-mass spectrometry: A report on technical principles and problem solutions, potential, and limitations of this technology as well as on examples of application*, Electrophoresis, 2005, **26**, 1584.
- [42]. A.M. Gañán-Calvo, *Generation of steady liquid microthreads and micron-sized monodisperse sprays in gas stream*, Phys. Rev. Letters, 1998, **80**, 285.
- [43]. B. Almagro, A.M. Gañán-Calvo, M. Hidalgo y A. Canals, *Flow focusing pneumatic nebulizer in comparison with several micronebulizers in inductively coupled plasma atomic emission spectrometry*, J. Anal. At. Spectrom., 2006, **21**, 770.
- [44]. B. Almagro, A.M. Gañán-Calvo y A. Canals, *Preliminary characterization and fundamental properties of aerosols generated by a flow focusing pneumatic nebulizer*, J. Anal. At. Spectrom., 2004, **19**, 1340.
- [45]. D.P. DePonte, U. Weierstall, K. Schmidt, J. Warner, D. Starodub, J.C.H. Spence y R.B. Doak, *Gas dynamic virtual nozzle for generation of microscopic droplet streams*, J. Phys. D: Appl. Phys., 2008, **41**, 195505.
- [46]. M. Sperling, S. Xu y B. Welz, *Determination of chromium(III) and chromium(VI) in water using flow injection on-line preconcentration with selective adsorption on activated alumina and flame atomic absorption spectrometric detection*, Anal. Chem., 1992, **64**, 3101.
- [47]. B.-H. Li y X.-P. Yan, *Short-column CE coupled with inductively coupled plasma MS for high-throughput speciation analysis of chromium*, Electrophoresis, 2007, **28**, 1393.
- [48]. B. Deng y W.T. Chan, *Simple interface for capillary electrophoresis-inductively coupled plasma atomic emission spectrometry*, J. Chromatogr. A, 2000, **891**, 139.
- [49]. C.-F. Yeh y S.-J. Jiang, *Speciation of V, Cr and Fe by capillary electrophoresis-bandpass reaction cell inductively coupled plasma mass spectrometry*, J. Chromatogr. A, 2004, **1029**, 255.

VI. CONCLUSIONES GENERALES

Las principales conclusiones derivadas del desarrollo de la investigación que se recoge en la presente memoria son las siguientes:

- **Capítulo 1:** La aplicación de la energía de microondas ha permitido acelerar y favorecer el proceso de elución de los analitos lo que ha permitido obtener una recuperación cuantitativa con un alto grado de preconcentración lo que ha mejorado apreciadamente los límites de detección. Esto, junto con los buenos resultados obtenidos en el análisis de materiales certificados de referencia, ha demostrado la viabilidad del concepto así como su posible aplicación en el análisis rutinario de muestras reales.

- **Capítulo 2:** El éxito en la optimización y en la aplicación al análisis de muestras certificadas de referencia del prototipo de nebulizador múltiple desarrollado han confirmado la potencialidad del principio de nebulización “Flow Focusing”[®] para la construcción de sistemas de preparación de la muestra dentro de la cámara de nebulización.

- **Capítulo 3:** Los resultados obtenidos en el análisis de muestras complejas de alimentos mediante plataformas microfluídicas con detección electroquímica han mostrado el alto nivel de madurez de las tecnologías miniaturizadas. Dichos resultados se pueden considerar como un paso más hacia la utilización de los microchips en análisis de rutina.

- **Capítulo 4:** El principio de nebulización “Flow Focusing”[®] ha sido integrado con éxito en un sistema de separación por electroforesis capilar y detección mediante espectrometría por plasma de acoplamiento inductivo. Los resultados iniciales obtenidos de esta investigación han demostrado las posibilidades que presenta el concepto propuesto para construcción futura de dispositivos simples y robustos dedicados a la especiación elemental.

- **Finalmente, y de forma general, en el presente trabajo se han propuesto, desarrollado y estudiado nuevas estrategias de la preparación de la muestra con la finalidad última de mejorar así una de las etapas más críticas del proceso analítico total.**

The principal conclusions derived by the work in this memory are the following:

- **Chapter 1:** *The application of microwave energy has effectively accelerated the elution process in solid phase extraction, which permitted quantitative recovery of the analytes when using a small eluent volume, high preconcentration factors and low detection limits in combination with ICP-MS determination. These results, and the successful determination of Pd in certified reference material has shown the viability of the concept and has opened the way to the application of the method to real samples.*

- **Chapter 2:** *The successful application of the Flow Focusing[®]-based multiple sample introduction system prototype to the analysis of certified reference material with complicated matrix has shown its great potential as a tool for online sample preparation by aerosol mixing.*

- **Chapter 3:** *The results obtained in real sample analysis using the strategies proposed as well as the simplified integration approaches shown; suggest that a high level of maturity of the microfluidic technology has already been achieved. These results might be considered as a further step to the use of microchips for routine analysis.*

- **Chapter 4:** *The Flow Focusing[®] nebulization principle has been successfully integrated to a capillary electrophoresis separation system. The initial results obtained suggest that the concept is potentially viable as a base of a future development of simple and robust devices for routine elemental speciation.*

- **In general,** *the current presentation summarizes the proposal, development and evaluation of new strategies for sample preparation that successfully fulfilled the initial aim to contribute in the improvement of one of the most critical stages of the total analytical process.*