

# Quimioluminiscencia: una interesante alternativa para la detección analítica en sistemas de flujo

*Unfamiliar though exciting analytical detection in flowing streams: chemiluminescence*

GARCÍA-CAMPAÑA, AM.<sup>1</sup>, BAEYENS WRG<sup>2</sup>; ZHANG X<sup>3</sup>; ALÉS F<sup>1</sup>, GÁMIZ L<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> University of Granada, Faculty of Sciences, Dept. of Analytical Chemistry,  
Avda. Fuentenueva s/n, E-18071 Granada, Spain

<sup>2</sup> Ghent University, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Dept. of Pharmaceutical Analysis,  
Harelbekestraat 72, B-9000 Ghent, Belgium

<sup>3</sup> Tsinghua University, Dept. of Chemistry, Analysis Center, Tsinghua Yuan, Beijing 100084, P. R. China

## RESUMEN

El estudio del tipo de interacción involucrada en la formación de dispersiones sólidas de tolbutamida con distintas proporciones de acetamida y propianamida, ha requerido del diseño y validación de un método analítico por cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE) que permita cuantificar la proporción de los transportadores en mezclas físicas y en dispersión sólida. El método resultó ser lineal, preciso y exacto en el intervalo de concentración de 100-1,56 µg/mL para tolbutamida y 50-0,781 µg/mL para acetamida y propianamida.

PALABRAS CLAVE: tolbutamida, propianamida, acetamida, cromatografía líquida, CLAE.

## ABSTRACT

*The interest to design and validate a high performance liquid chromatography method for quantification of tolbutamide, acetamide and propianamide in solid dispersions, was to find a relation among the amount of carriers and the active substance in solid dispersions, in order to further investigate the drug-carrier interaction pattern responsible of solid dispersion formation. The method was lineal, precise and accurate in the concentration range between 100.0 - 1.56 µg/mL for tolbutamide and 50.0 - 0.78 µg/mL for acetamide and propianamide.*

**KEY WORDS:** tolbutamide, propianamide, acetamide, HPLC.

## INTRODUCCIÓN

El uso analítico de la quimioluminiscencia (QL) está experimentando un creciente interés, ya que representa una alternativa simple, barata y sensible para cuantificar una gran variedad de compuestos.

Desde hace unos treinta años, el fenómeno de la luminiscencia -originalmente una curiosidad del laboratorio físico-, se ha convertido en una rama de la espectrometría aplicada, dentro de la química analítica. Debido a la nueva instrumen-

## INTRODUCTION

Chemiluminescence (CL)-based analysis is growing fast offering simple, low cost and sensitive means of measuring a variety of compounds.

Since over 30 years, the phenomenon of luminescence -originally a curiosity in the physical laboratory- has provided a well-established and widely applied spectrometric branch of analytical chemistry. Owing to elegant new instrumentation and especially to new techniques, some of which entirely new and some borrowed from

tación y, especialmente a la incorporación de técnicas modernas, algunas nuevas y otras tomadas de otras disciplinas, la QL y la bioluminiscencia (BL) se aplican de forma rutinaria en el análisis tanto cuali- como cuantitativo.

Aunque el fenómeno de la QL se conoce desde 300 años a.C., el desarrollo de aplicaciones analíticas es relativamente reciente. Debido a su alta sensibilidad y selectividad, los métodos basados en detecciones QL suponen una herramienta analítica de gran utilidad. La primera aplicación de la QL como técnica analítica la llevó a cabo Erdey en 1957, que estudió el uso de varias sustancias, como luminol, lofina y lucigenina, como indicadores volumétricos. Las investigaciones sobre el potencial analítico de la QL para análisis de rutina datan de los años 70, en el caso de reacciones en fase gaseosa, y de la década de los 80 para reacciones en fase líquida. Desde entonces, los métodos quimioluminiscentes han sido más ampliamente utilizados, fundamentalmente en análisis bioquímico y ambiental, y el número de publicaciones y comunicaciones sobre el tema ha ido incrementando de forma exponencial desde la celebración del primer Simposio Internacional sobre Bioluminiscencia y Quimioluminiscencia, celebrado en Bruselas en 1978. De hecho, en el desarrollo de métodos QL pueden diferenciarse dos periodos: una primera etapa (1928-1940) caracterizada por la búsqueda de nuevos compuestos o sistemas quimioluminiscentes, por medio de modificaciones químicas de estructuras bien conocidas, y, desde la 2ª Guerra Mundial hasta el presente, un avance en la instrumentación, junto con el desarrollo de conceptos teóricos de los, a veces, complejos principios de la QL.

Las grandes aplicaciones analíticas de la QL como método de detección en inyección en flujo, cromatografía líquida (CL) y electroforesis capilar (EC), junto con el gran potencial del inmunoensayo, hacen de esta técnica un campo de investigación muy interesante en una amplia variedad de disciplinas, que incluyen técnicas de separación en análisis químico, biológico, farmacéutico, biomédico y alimentario, control de calidad, etc.

Las tendencias más actuales en química analítica implican la aplicación de la QL como sistema de detección, combinada con EC como método previo de separación, proporcionando una selectividad y sensibilidad analítica excelentes y

other disciplines, CL and bioluminescence can be routinely applied to qualitative and quantitative analytical problems.

Although the luminescence phenomena are known since over 300 years before Christ, the development of CL analytical applications is relatively recent. Due to its high sensitivity and selectivity, CL-based detection has become quite a useful analytical technique. The first application of CL as analytical tool was carried out by Erdey in 1957, who studied the use of several substances as luminol, lophine and lucigenine as volumetric indicators. Investigations on the potentials of CL for analytical routine applications date from the seventies for gas phase and from the eighties for liquid phase reactions. Since then, CL methods have been more widely used, mainly in biochemical and environmental analysis, the number of articles and communications exponentially increasing since the first Bioluminescence and Chemiluminescence International Symposium held in Brussels back in 1978. In fact, the development of CL methods can be differentiated in two stages: a first period (1928-1940) characterized by the search of new chemiluminescing compounds or systems by means of chemical modifications of well-known structures and, since the 2nd World War until to-day, a growing progress in the instrumentation together with the development of theoretical concepts on the often complex CL principles.

The powerful analytical applications of CL as a detecting tool in flow injection, column liquid chromatographic and in capillary electrophoretic separating systems, together with the potentials in immunoassays make this technique a most interesting field of research for scientists in a wide variety of disciplines, including separation sciences in chemistry, biology, pharmaceutical, biomedical and food analysis, the various quality control areas, etc.

A recent trend in analytical chemistry involves the application of CL as detection system in combination with capillary electrophoresis as prior separation methodology, providing excellent analytical sensitivity and selectivity and allowing the resolution and quantification of various analytes in relatively complex mixtures [1].

Until the nineties, chemiluminometric detection was not applied after capillary electrophoretic separation, but fast developments from some important research groups and companies have

permitiendo la resolución y cuantificación de varios analitos en mezclas relativamente complejas [1].

Hasta la década de los noventa, la detección por QL no había sido acoplada a la EC, pero en estos últimos años, se han publicado importantes desarrollos por parte de algunas compañías y grupos de investigación, por lo que se esperan futuras contribuciones sobre el tema.

El número de reacciones quimioluminiscentes citadas en bibliografía, con aplicaciones en química, biomedicina, alimentación, medioambiente y toxicología, se ve incrementado anualmente.

Combinado con separaciones por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), se han empleado varias reacciones quimioluminiscentes, entre otras con peroxioxalato, luciferasa, lucigenina y luminol, siendo la más común la reacción con peroxioxalato en detección post-columna acoplada a cromatografía líquida, tanto convencional como empleando microcolumnas. Asimismo, se han empleado sistemas de flujo continuo con detección basada en QL, para la determinación de varios fármacos y analitos de interés biológico.

Hoy en día, el interés analítico de la QL está aumentando considerablemente debido a las ventajas ya comentadas, como bajos límites de detección, rangos dinámicos amplios, alta sensibilidad y la gran versatilidad de los métodos QL. Recientemente, las investigaciones se están centrando especialmente en el desarrollo de productos quimioluminiscentes para aplicaciones de diagnóstico clínico; así, la QL es hoy en día un posible sustituto del marcado isotópico, reemplazando así el uso de radioisótopos. La QL se aplica también en el control de calidad de productos cárnicos y residuos, existiendo igualmente aplicaciones en la medida del ozono ambiental.

Considerablemente ventajosa resulta la sensibilidad que ofrecen las reacciones basadas en QL en diversos ámbitos del análisis aplicado, por ejemplo en la determinación de compuestos prohibidos en diversas matrices. Así, el interés de la QL en química analítica en la última década queda demostrado por el número de artículos publicados en revistas de gran prestigio (*Analytical Chemistry*, *The Analyst*, *Analytica Chimica Acta*, *Fresenius' Zeitschrift für Analytische Chemie*, *Journal of Microcolumn Separations*, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, entre otras) y por la aparición de una revista

been noticed in these last years; hence further developments are expected.

The number of reactions producing CL cited in the literature is increasing annually, with analytical applications in chemical, biomedical, food, environmental and toxicological disciplines. In combination with HPLC separations, several CL reactions have been used, amongst others, peroxyoxalate, firefly luciferase, lucigenin and luminol, the peroxyoxalate reaction being the most commonly used CL-based system for post-column detection in conventional and in microcolumn LC set-ups. Continuous flow CL-based detection of several analytes has been widely applied by several groups for the determination of diverse biological compounds and drugs.

Today, analytical interest in the application of CL is growing considerably due to the cited advantages as low detection limits, wide dynamic ranges, high sensitivity and the versatility of chemiluminometric methods. Recently, increasing interest was focussed on CL products for life sciences research; in clinical diagnostics, for example, CL is nowadays suggested as a sensitive substitute for isotopic labelling, replacing radioisotopes. CL is applied as well in the quality control of meat products and residues and future projects are focussed on environmental ozone measurements.

The sensitivity offered by CL-based reactions is often needed, for example in the assay of illicit compounds within various matrices. Moreover, the interest in analytical CL for the last decade can be illustrated by the number of published papers in prestigious analytical journals (e.g., *Analytical Chemistry*, *The Analyst*, *Analytica Chimica Acta*, *Fresenius' Zeitschrift für Analytische Chemie*, *Journal of Microcolumn Separations*, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, to name a few) and by the existence of a dedicated specific journal, the *Journal of Biological and Chemical Luminescence*.

It is clear that the need for improving detection technology is nowadays related to the general trend in analytical chemistry to miniaturize and thus reduce waste volumes of organic solvents in separational set-ups, and by using more aqueous systems, studying smaller samples at increasingly lower concentrations. As the CL technique may provide improvement in these situations, the instrumentation for CL measurements and the coupling with a selective physical or chemical interface to achieve selective mea-

específica: Journal of Biological and Chemical Luminescence.

Siguiendo la tendencia general en química analítica, la mejora en los métodos de detección está dirigida actualmente a la miniaturización y, por lo tanto, a reducir el gasto de disolventes orgánicos en métodos de separación, empleando más sistemas acuosos y volúmenes de muestra menores con concentraciones inferiores. Como las técnicas quimioluminiscentes pueden proporcionar mejoras en estas situaciones, la instrumentación para medidas quimioluminiscentes y el desarrollo de acoplamientos con interfaces selectivas físicas o químicas que permitan medidas selectivas están también dirigidos a conseguir este fin, de modo que puedan eliminarse las desventajas de las técnicas basadas en medidas directas de QL (como falta de selectividad o dependencia de factores físico-químicos). Así, se están publicando progresivamente avances específicos en cromatografía, EC, inmunoensayo y en el uso de reactores enzimáticos. Desde este punto de vista, los sistemas miniaturizados ("microchip") son muy atractivos, ya que puede resolver el problema de los límites de detección poco satisfactorios característicos de estos sistemas.

Asimismo, el problema del gasto de disolvente está potenciando gradualmente el uso de sistemas analíticos de separación miniaturizados, tales como la cromatografía líquida capilar y de columnas de pequeño diámetro ("narrow-bore") frente a la CLAR, cromatografía en capa fina de alta resolución miniaturizada, y recientemente EC. Debido a que la QL puede resolver las limitaciones en la detección en estos casos, resulta previsible el desarrollo de este acoplamiento en la próxima década. Como ejemplo, puede mencionarse un sistema descrito recientemente, basado en detección quimioluminiscente de enzimas y que emplea la técnica denominada "microensayo a través de electroforesis" (EMMA, electrophoretically mediated microassay), que permite la detección de enzimas a niveles de *zeptomoles*, tanto en capilares abiertos como en canales realizados en microchips, detectándose la oxidasa y catalasa a niveles de 9000 moléculas y empleando una instrumentación relativamente económica.

Sin ninguna duda, cuando se compara con otros métodos de detección convencionales y potentes (fluorescentes o electroquímicos), la detección QL es una técnica en pleno desarrollo y sus avances

surements is likewise aimed at. In this way, disadvantages of direct CL-based techniques (e.g., lack of selectivity, sensitivity to various physico-chemical factors) are avoided. Specific developments in chromatography, capillary electrophoresis, immunoassay and the use of enzyme reactions are being progressively reported. Microchip-sized systems are attractive from this point of view, as the problem of modest to unsatisfactory detection limits characteristic for these systems may be overcome.

Moreover, the problem of waste disposal is gradually forcing analytical separating systems into miniaturization, e.g., narrow-bore and capillary liquid chromatography *versus* high performance liquid chromatography (HPLC), miniaturized high performance thin layer chromatography (HPTLC), and, for recent years, capillary electrophoresis.

As the CL phenomenon may be applied to solve the problem of detection limitations in particular in narrow-bore liquid chromatographic and capillary electrophoretic set-ups, not using hazardous labels, the former technique is bound to be thoroughly explored for the coming decade. As an example, it may be mentioned that in recent years a CL-based detection system using EMMA (electrophoretically mediated microassay) of enzymes was described, allowing the detection of enzymes at the *zeptomole* level in both open tubular capillaries and channels in microfabricated devices, oxidase and catalase being detected at levels of 9000 molecules employing inexpensive instrumentation.

Without any doubt, when compared to other, conventional and powerful detection modes (fluorescence, electrochemical), CL detection is a developing technique and advances are focused on the development of new detectors that are instrumentally simpler than existing ones and that offer the ability to detect various types of analytes at trace levels.

## FUNDAMENTALS OF CHEMILUMINESCENCE

Chemiluminescence is defined as the emission of electromagnetic radiation (usually in the visible or near infrared region) produced by a chemical reaction.

When this emission originates from living organisms or from chemical systems derived from

se dirigen hacia el desarrollo de nuevos detectores más simples que los ya existentes y que ofrezcan la posibilidad de determinar varias clases de analitos a niveles traza.

## FUNDAMENTOS DE LA QL

La QL se define como la emisión de radiación electromagnética (normalmente en la región del visible o del infrarrojo cercano) producida por una reacción química. Cuando esta emisión proviene de organismos vivos o sistemas derivados de ellos, se denomina bioluminiscencia. Ambos fenómenos son procesos luminiscentes que se han identificado tradicionalmente mediante un prefijo que identifica la fuente de energía responsable del inicio de la emisión de radiación electromagnética. Actualmente, los procesos de luminiscencia se han incluido en la lista de fenómenos luminiscentes, como se indica en la Tabla 1.

Como la intensidad de emisión es función de la concentración de las especies químicas implicadas en la reacción QL, las medidas de la intensidad de emisión pueden emplearse con fines analíticos. Una ventaja de las técnicas QL es que permiten emplear una instrumentación básica bastante sencilla, ya que el sistema óptico no requiere fuente externa de excitación. La QL se describe a menudo como una técnica de “campo oscuro”: la ausencia de niveles altos de luz de fondo, que sí ocurren en espectrofotometría y fluorimetría, reduce el ruido y permite mejorar los límites de detección. La instrumentación para medidas de QL varía desde sistemas muy simples hasta instrumentación más compleja, pudiéndose usar un fluorímetro simplemente con la fuente de excitación apagada.

No obstante deben considerarse algunas limitaciones en el análisis por QL, como la dependencia de la emisión quimioluminiscente de varios factores ambientales que deben ser controlados, la falta de selectividad, ya que un reactivo quimioluminiscente no se limita a un único analito, y finalmente, como ocurre en otros sistemas de detección en flujo, la emisión quimioluminiscente no es constante sino que varía con el tiempo (el flash de luz está compuesto de una señal que se produce tras la mezcla de los reactivos, alcanza un máximo y después cae hasta la línea de base), y este perfil de emisión frente al tiempo puede variar ampliamente en diferen-

it, it is named bioluminescence (BL). Both phenomena are luminescence processes that have been traditionally distinguished from related emissions by a prefix that identifies the energy source responsible for the initiation of emission of electromagnetic radiation. Contemporary luminescence processes have been added to the list of luminescence phenomena, as can be seen in Table 1.

Because the emission intensity is a function of the concentration of the chemical species involved in the CL reaction, measurement of emission intensities can be used for analytical purposes. An advantage of CL techniques is that it is possible to employ rather simplified basic instrumentation, as the optical system requires no external light source. CL is often described as a dark-field technique: the absence of strong background light levels, such as found in spectrophotometry and fluorimetry, reduces noise signals and leads to improved detection limits. Instrumentation for CL measurements ranges from simple to very complex, that is, allowing the use of a fluorometer by turning off the excitation source, or applying the facilities offered by more sophisticated systems.

However, some limitations are to be considered in CL analysis, such as the dependence of the CL emission on several environmental factors that hence must be controlled, the lack of selectivity because a CL reagent is not limited to just one unique analyte, and finally, like other mass flow detection approaches, since CL emission is not constant but varies with time (light flash composed of a signal increase after reagent mixing, passing through a maximum, then declining to the baseline), and this emission versus time profile can widely vary in different CL systems, care must be taken so as to detect the signal in flowing streams at strictly defined periods.

### 2.1. Mechanisms of chemiluminescence reactions

In general, a chemiluminescent reaction can be generated by two basic mechanisms (**Figure 1**). In a direct reaction, two reagents, usually a substrate and an oxidant in the presence of some cofactors, react to form a product or intermediate, sometime in presence of a catalyst. Then some fraction of the product or intermediate will be formed in an electronically excited state, which can subsequently relax to the ground state with

TABLA I. Clasificación de los fenómenos luminiscentes.

TABLA I. Classification of luminescence phenomena.

|                                                                                                                                                                                             |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Producidos por irradiación</b>                                                                                                                                                           |
| A) Fotoluminiscencia: El estado excitado se produce por la absorción de radiación ultravioleta, visible o de infrarrojo próximo                                                             |
| - <b>Fluorescencia: Emisión de vida corta a partir de un estado singlete electrónicamente excitado</b>                                                                                      |
| - Fosforescencia: Emisión de vida larga a partir de un estado triplete electrónicamente excitado                                                                                            |
| 1. Catodoluminiscencia: Emisión producida por irradiación de partículas $\beta$                                                                                                             |
| 2. Anodoluminiscencia: Emisión producida por irradiación de partículas $\alpha$                                                                                                             |
| D) Radioluminiscencia: Emisión producida por irradiación de partículas $\gamma$ o rayos X                                                                                                   |
| <b>Producidos por calentamiento</b>                                                                                                                                                         |
| 2. Candoluminiscencia: Emisión por sólidos incandescentes                                                                                                                                   |
| 3. Termoluminiscencia: Emisión por sólidos y cristales en caliente                                                                                                                          |
| C) Piroluminiscencia: Emisión por átomos metálicos en llama                                                                                                                                 |
| <b>Producidos por reordenamientos estructurales en sólidos</b>                                                                                                                              |
| A) Triboluminiscencia: Emisión por cristales friccionados o triturados                                                                                                                      |
| B) Cristaloluminiscencia: Emisión por cristalización                                                                                                                                        |
| C) Lioluminiscencia: Emisión por cristales disueltos                                                                                                                                        |
| <b>Producidos por fenómenos eléctricos</b>                                                                                                                                                  |
| A) Electroluminiscencia: Emisión por descargas eléctricas                                                                                                                                   |
| B) Galvanoluminiscencia: Emisión durante la electrolisis                                                                                                                                    |
| C) Sonoluminiscencia: Emisión por exposición a ondas ultrasónicas en solución                                                                                                               |
| D) Piezoluminiscencia: Emisión por separación de cargas por fricción en la superficie de cristales                                                                                          |
| <b>Producidos por reacciones químicas</b>                                                                                                                                                   |
| A) Bioluminiscencia: Emisión por organismos vivos o sistemas biológicos                                                                                                                     |
| B) Quimioluminiscencia: Emisión por una reacción química                                                                                                                                    |
| - Electroquimioluminiscencia: Emisión que se produce en solución, a partir de un estado electrónicamente excitado producido en una reacción de transferencia de alta energía de un electrón |
| - Quimioluminiscencia Electrogenada: Emisión producida en la superficie de un electrodo                                                                                                     |

tes sistemas quimioluminiscentes, por lo que hay que extremar el cuidado para detectar la señal en sistemas en flujo, midiendo en periodos de tiempo bien definidos.

### 2.1. Mecanismos de las reacciones QL

En general, una reacción QL puede generarse mediante dos mecanismos básicos (**Figura 1**). En una reacción directa, dos reactivos, normalmente un sustrato y un oxidante en presencia de algunos cofactores, reaccionan para formar un producto o intermedio de la reacción, algunas veces en presencia de un catalizador. Después,

emission of a photon. The substrate is the CL precursor, which is converted into the electronically excited molecule, responsible for light emission or acting as the energy transfer donor in indirect CL. The catalyst, enzyme or metal ion, reduces the activation energy and provides an adequate environment for producing high CL efficiency of the process. Cofactors sometimes are necessary to convert one or more of the substrates into a form capable of reacting and interacting with the catalyst, or to provide an efficient leaving group if bond cleavage is required to produce the excited emitter. On the contrary, indirect or sensitised CL is based on a process of

parte del producto o intermedio pasa a un estado electrónicamente excitado, que puede a continuación relajarse hasta el estado fundamental con emisión de un fotón. El sustrato es el precursor QL, que se convierte en la molécula excitada electrónicamente, responsable de la emisión de luz, o bien actúa para transferir la energía en la QL indirecta. El catalizador, enzima o ion metálico, reduce la energía de activación y proporciona el ambiente adecuado para la producción de una alta eficiencia QL durante el proceso. Los cofactores son necesarios en ocasiones para convertir uno o más de los sustratos en una forma capaz de reaccionar e interactuar con el catalizador, o para proporcionar un grupo “saliente” eficaz cuando se requiere un marcado para producir el emisor excitado. Por el contrario, la QL indirecta o sensibilizada se basa en un proceso de transferencia de energía de la especie excitada a un fluoróforo. En el caso de moléculas que no pueden emitir directamente QL, este proceso permite transferir su exceso de energía a un fluoróforo que a su vez es excitado, volviendo a su estado fundamental con la emisión de un fotón. Todas estas etapas dan lugar a una gran variedad de aplicaciones prácticas de la QL en la fase sólida, líquida y gaseosa.

transfer of energy of the excited specie to a fluorophore. This process makes it possible for those molecules that are unable to be directly involved in CL reactions to transfer their excess of energy to a fluorophore that in turn is excited, releasing to its ground state with photon emission. All of these paths lead to a great variety of practical uses of CL in solid, gas and liquid phases.

## 2.2. Requirements for chemiluminescence emission

For a chemical reaction to produce light, it should meet some essential requirements:

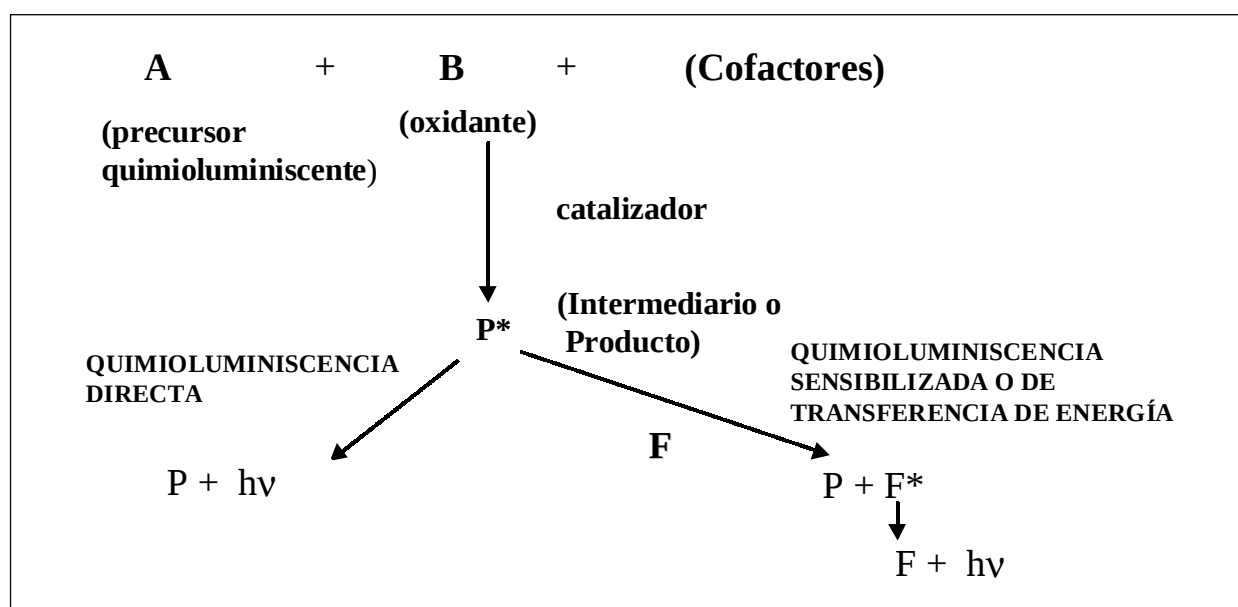
a) the reaction must be exothermic to produce sufficient energy to from the electronically excited state. In this sense, for CL to occur the energetic requirements can be established in terms of  $\Delta G$  (Kcal.mol<sup>-1</sup>):

$$-\Delta G \geq \frac{hc}{\lambda_{ex}} = \frac{2.86 \cdot 10^4}{\lambda_{ex}}$$

where  $\lambda_{ex}$  is the long-wavelength limit (nanometers) for excitation of the luminescent species. Because most of the CL reactions produce photons in the range 400 (violet) – 750 (red) nm,

FIGURA 1.- Tipos de reacciones en QL (P: producto; F: sustancia fluorescente).

FIGURE 1.- Types of CL reactions (P: product; F: fluorescing substance).



## 2.2. Requisitos de la emisión QL

Para que una reacción química emita luz, debe reunir algunos requisitos básicos:

a) la reacción debe ser exotérmica y producir la suficiente energía para formar el estado electrónicamente excitado. En este sentido, para que ocurra una reacción quimioluminiscente, los requisitos energéticos pueden establecerse en términos de  $\Delta G$  (Kcal.mol<sup>-1</sup>):

$$-\Delta G \geq \frac{hc}{\lambda_{ex}} = \frac{2.86 \cdot 10^4}{\lambda_{ex}}$$

donde  $\lambda_{ex}$  es la longitud de onda límite (nanómetros) para la excitación de las especies luminiscentes. Como la mayoría de las reacciones quimioluminiscentes producen fotones en el rango comprendido entre 400 (violeta) - 750 (rojo) nm, la formación del estado electrónicamente excitado y la generación de QL en la región del visible requiere alrededor de 40-70 Kcal.mol<sup>-1</sup>. Esta condición exotérmica se asocia a las reacciones redox que emplean oxígeno, peróxido de hidrógeno u oxidantes de potenciales similares.

b) El camino de reacción debe ser favorable a canalizar la energía hacia la formación de un estado electrónicamente excitado. En el caso de que la energía química se disipe en forma de calor, mediante vibraciones o rotaciones moleculares, la reacción no será quimioluminiscente.

c) la emisión de un fotón debe ser un proceso de desactivación del producto excitado favorable en relación a otros procesos no radiantes que pueden aparecer en pequeña proporción, como disociación molecular, reacciones químicas con otras especies, transferencia de energía intra- o intermolecular, isomerización o atenuación física. En el caso de QL sensibilizada, tanto la eficacia y energía de transferencia de las especies excitadas al fluoróforo como la eficacia de la fluorescencia de este último deben ser considerables.

En todos los procesos luminiscentes, la intensidad de la emisión producida depende de la eficacia al generar moléculas en el estado excitado, lo cual viene representado por la eficiencia cuántica (rendimiento cuántico) y la velocidad de la reacción. En el caso de reacciones quimioluminiscentes, la intensidad puede expresarse como:

the creation of the electronically excited state and the generation of CL in the visible region require around 40-70 Kcal.mol<sup>-1</sup>. This exothermic condition is associated to redox reactions using oxygen and hydrogen peroxide or similar potential oxidants.

b) the reaction pathway must be favourable to channel the energy for the formation of an electronically excited state. In case the chemical energy is lost as heat, e.g., via vibrational and rotational energy ways, the reaction will not be chemiluminescent.

c) photon emission must be a favourable deactivation process of the excited product in relation to other competitive non-radiative processes that may appear in low proportion, such as molecular dissociation, chemical reaction with others species, intra- or intermolecular energy transfer, isomerization or physical quenching. In the case of sensitised CL, both the efficiency of energy transfer from the excited species to the fluorophore and the fluorescence efficiency of the latter must be substantial.

In all luminescent processes, the intensity of the produced emission depends on the efficiency of generating molecules in the excited state, which is represented by the quantum efficiency (quantum yield) and the rate of the reaction. In the case of CL reactions, the intensity can be expressed as:

$$I_{CL} = \phi_{CL} \frac{-dA}{dt}$$

being  $I_{CL}$  the CL emission intensity (photons/seconds),  $\phi_{CL}$ , the CL quantum yield and  $(-dA/dt)$  the rate at which the CL precursor A is consumed. Higher values of quantum yields are usually associated with BL reactions whereas in most of the CL reactions used for analytical purposes,  $\phi_{CL}$  ranges from 0.001-0.1, and even very inefficient systems with much lower quantum yields can be used in analysis based on the almost complete absence of background emission. This is the case of ultraweak CL reactions, in which  $\phi_{CL}$  can be less than 0.001 (often 10<sup>-3</sup>-10<sup>-8</sup> and sometimes 10<sup>-9</sup>-10<sup>-15</sup>). Ultraweak CL is produced from oxidative reactions in living cells and the emitted signals are mostly between 10<sup>3</sup>-10<sup>6</sup> times less intense than those from luminous organisms. It is invisible to the

$$I_{CL} = \phi_{CL} \frac{-dA}{dt}$$

donde  $I_{QL}$  es la intensidad de emisión quimioluminiscente (fotones/segundo),  $\phi_{QL}$  es el rendimiento cuántico y  $(-dA/dt)$  la proporción en la que el precursor quimioluminiscente, A, es consumido. Los valores altos de rendimiento cuántico se asocian normalmente con reacciones de BL, mientras que en la mayoría de las reacciones quimioluminiscentes empleadas para fines analíticos,  $\phi_{QL}$  varía entre 0.001-0.1, e incluso sistemas bastante ineficaces, con rendimientos cuánticos inferiores, pueden emplearse en análisis basados en la ausencia casi absoluta de emisión de fondo. Tal es el caso de reacciones quimioluminiscentes ultradébiles, en las que  $\phi_{QL}$  puede ser inferior a 0.001 (a menudo  $10^{-3}$ - $10^{-8}$  y algunas veces  $10^{-9}$ - $10^{-15}$ ). La QL ultradébil se produce a partir de reacciones de oxidación en células vivas y las señales emitidas son a menudo  $10^3$ - $10^6$  veces menos intensas que las de organismos luminosos, siendo invisibles a simple vista. Este tipo de QL incluye un grupo de reacciones quimioluminiscentes que, al menos en células vivas, implica cierto número de intermediarios oxigenados y que juega un papel importante en ciertos tipos de activación celular, en los sistemas de defensa del cuerpo y en enfermedades coronarias. Se han detectado en gran variedad de órganos intactos, células aisladas y tejidos homogéneos de vertebrados, invertebrados y plantas, y en varias reacciones *in vitro*. La QL ultradébil se asocia a algunas importantes funciones celulares, como la respiración mitocondrial, fotosíntesis, división celular o fagocitosis, entre otras [2].

### 2.3. Factores que influyen en la emisión QL

Las medidas de QL están fuertemente influenciadas por aquellos factores experimentales que afectan al rendimiento cuántico y a la velocidad de reacción, como son:

- La estructura química del precursor quimioluminiscente, no solamente la parte que contiene al grupo excitado electrónicamente, sino también las cadenas laterales.
- La naturaleza y concentración de otras sustancias que afectan el proceso de QL y que favorecen otros procesos competitivos no radiantes.

naked eye. This kind of CL in fact includes a group of CL reactions which, at least in living cells, involve a number of oxygen intermediates and that play an important role in certain types of cell activation, in the defense system of the body and in ischaemic heart diseases. It has been detected from a wide variety of intact organs, isolated cells and tissue homogenates from vertebrates, invertebrates, plants, and from several reactions *in vitro*. The ultraweak CL is associated with some important cellular functions, such as mitochondrial respiration, photosynthesis, cell division or phagocytosis, amongst other [1].

### 2.3. Factors influencing chemiluminescence emission

Because of the cited dependence of CL intensity upon various parameters, CL measurements are strongly modified by experimental factors that affect quantum yield and rate of reaction, such as:

- the chemical structure of the CL precursor, not only the central portion containing the electronically excited group, but also the side chain
- the nature and concentration of other substrates affecting the CL pathway and favouring other non-radiative competitive processes
- the selected catalyst
- the presence of metal ions, specially transition metals involved in the processing of the oxidant
- the temperature
- pH and ionic strength
- the hydrophobicity of the solvent and solution composition (as example, the  $\phi_{CL}$  of luminol oxidized in dimethylsulphoxide (DMSO) is 0.05 compared with 0.01 in water, the colours being blue-violet (425 nm) and blue-green (480-502 nm), respectively)
- the presence of energy transfer acceptors.

### 2.4. Characteristics of chemiluminescence as analytical technique

Because the reaction rate is a function of the chemical concentration, CL techniques are suitable

- El catalizador seleccionado.
- La presencia de iones metálicos, especialmente metales de transición implicados en el proceso de oxidación.
- La temperatura
- pH y fuerza iónica
- La hidrofobicidad del disolvente y la composición de la disolución (por ejemplo, la  $\phi_{QL}$  del luminol oxidado en dimeilsulfóxido (DMSO) es 0.05 comparado con 0.01 en agua, siendo los colores azul-violeta (425 nm) y verde-azulado (480-502 nm), respectivamente)
- La presencia de aceptores de la energía transferida

#### 2.4. Características de la QL como técnica analítica

Como la velocidad de la reacción es función de las concentraciones de reactivos, la QL es una técnica adecuada para el análisis cuantitativo. La utilidad de los sistemas quimioluminiscentes en química analítica se basa en algunas características especiales, que se comentan a continuación.

a) La técnica comprende simultáneamente características cinéticas y luminiscentes, por lo que proporciona una alta sensibilidad y un amplio rango dinámico. Si  $\phi_{QL}$  es lo suficientemente alta, se pueden alcanzar límites de detección excelentes, en el rango de los femtomoles. Como ejemplo, en la fase gaseosa, los límites de detección habituales son de 10 pmol de NO empleando ozono, y 0.1 pmol para compuestos sulfurados empleando una llama de hidrógeno seguida de ozono; en la fase líquida, puede detectarse hasta 1 fmol de fluoróforo empleando el sistema quimioluminiscente con peroxioxalato, y 0.1 fmol de peroxidasa usando luminol. En comparación con otras técnicas espectrométricas, la QL es aproximadamente  $10^5$  veces más sensible que la espectrometría de absorción y al menos  $10^3$  veces más sensible que la fluorimetría.

b) Comparada con los procesos de fotoluminiscencia, no se requiere fuente de excitación externa, lo que ofrece algunas ventajas, como la ausencia de dispersión y señales fotoluminiscentes de fondo, la desaparición de problemas relacionados con la inestabilidad de la fuente externa, reducción de interferencias debidas a procesos de excitación no selectivos, y una instrumentación más simple.

ble for quantitative analysis. The usefulness of CL systems in analytical chemistry is based on some special characteristics cited hereafter.

a) As the technique simultaneously comprises kinetic and luminescence features, it provides high sensitivity and wide dynamic ranges. Excellent detection limits, in the range of femtomoles, can be reached if  $\phi_{CL}$  is high enough. As an example, in the gas phase, typical detection limits are of 10 pmol NO using ozone, and 0.1 pmol for sulfur compounds using a hydrogen flame followed by ozone; in the liquid phase down to 1 fmol of the fluorophore may be detected using the peroxyoxalate CL system, and 0.1 fmol peroxidase when using luminol. In comparison to other spectrometric techniques, CL is approximately  $10^5$  times more sensitive than absorption spectrometry and at least  $10^3$  times more sensitive than fluorimetry.

b) Compared to photoluminescence processes, no external light source is required, which offers some advantages such as the absence of scattering or background photoluminescence signals, the absence of problems related to instability of the external source, reduction of interferences due to a non-selective excitation process, and a simple instrumentation.

c) Selectivity and linearity are most dependent on the reaction and reaction conditions chosen. As for photoluminescence processes, absorption or emission radiation by the analyte, products or concomitants can cause nonlinearity or spectral interferences.

d) The technique is versatile for the determination of a wide variety of species that can participate in the CL process, such as: CL substrates or CL precursors responsible for the excited state; the necessary reagent for the CL reaction (usually an oxidant); some species that affects the rate or efficiency of the CL reaction: activators such as catalysts (enzymes or metal ions) or inhibitors such as reductants that inhibit the CL emission; fluorophores in the case of sensitized CL; some species that are not directly involved in the CL reaction but that can react with other reagents in coupled reactions to generate a product which is a reactant in the CL reaction; species that can be derivatized with some CL precursors or fluorophores, being determined by direct or sensitized CL.

e) Depending of the nature of the analyte and the CL reaction, the increase or decrease of CL

c) La selectividad y la linealidad son más dependientes de la reacción y de las condiciones de reacción escogidas. Como ocurre con los procesos fotoluminiscentes, la absorción o emisión de radiación por el analito, producto o cofactores, pueden causar pérdida de linealidad o interferencias espectrales.

d) La técnica es versátil para la determinación de una amplia variedad de especies que pueden participar en el proceso quimioluminiscente, como: substratos o precursores quimioluminiscentes responsables del estado excitado; el reactivo necesario para la reacción (normalmente un oxidante); algunas especies que afectan la velocidad o la eficacia de la reacción: activadores, como catalizadores (enzimas o iones metálicos), o inhibidores, como reductores que disminuyen la emisión quimioluminiscente; fluoróforos en el caso de QL sensibilizada; algunas especies que no están directamente implicadas en la reacción QL pero que pueden reaccionar con otros reactivos en reacciones acopladas para generar un producto que es un reactivo en la reacción QL; especies que pueden formar derivados con algún precursor quimioluminiscente o fluoróforo, determinándose mediante QL directa o sensibilizada.

e) Dependiendo de la naturaleza del analito y de la reacción QL, el incremento o disminución de la intensidad de QL estará directamente relacionada con la concentración de analito.

f) Las reacciones quimioluminiscentes pueden acoplarse fácilmente como método de detección en cromatografía, EC o inmunoensayo, proporcionando información cualitativa o cuantitativa sobre una gran variedad de especies en las fases gaseosa y líquida.

Como regla empírica, es probable que un compuesto exhiba QL cuando él o su producto derivado muestren propiedades fluorescentes. Es posible que la oxidación de tal especie produzca QL, aunque hay muchas excepciones a esta regla general.

## PRINCIPALES REACCIONES CL EN FASE LÍQUIDA

### 3.1. *Acilhidracidas*

El ejemplo más conocido en reacciones directas es la oxidación del luminol (5-amino-2,3-

intensity will be directly related to the analyte concentration.

f) CL reactions can be easily coupled as detection technique in chromatography, capillary electrophoresis or immunoassay, providing qualitative or quantitative information of a large variety of species in the gas and liquid phases.

As an empirical rule, CL behavior may be predicted in the case a compound or its derivatization product show fluorescence properties. It is possible that oxidation of such a specie may produce CL, but there are many exceptions to this general rule.

## MAIN LIQUID-PHASE CL REACTIONS

### 3.1. *Acyl Hydrazides*

The best known example in direct reactions is the oxidation of luminol (5-aminophthalylhydrazide) in alkaline medium, to produce excited 3-aminophthalate ion (**Figure 2**). Oxidants such as permanganate, hypochlorite, or iodine can be used but most useful is hydrogen peroxide. The reaction is catalysed by metal ions (Fe(II), Cu(II), Co(II), amongst others), ferricyanide or some metal complexes (hemin, haemoglobin and peroxidases). In this sense, this reaction has been applied for the determination of catalysts such as metal ions or enzymes (peroxidases, hematic compounds, etc.), certain oxidants, inhibitors or substances that are easily oxidised and are determined indirectly measuring the decreased CL emission. Also, luminol has been extensively used in medico-legal investigations in presumptive tests to detect trace quantities of blood which are not visible to the naked eye, e.g., areas intentionally wiped clean of blood, washed clothes, dark surfaces, etc. [2]. In fact, the application of fresh luminol by spraying -after allowing the previous applications to dry- can reactivate the luminescence, and hematin can be detected in a dilution of 1:10<sup>8</sup>.

### 3.2. *Imidazoles*

Lophine (2,4,5-triphenylimidazole) is the most representative of the imidazole CL precursors. A yellow light is produced by oxidation of lophine with peroxide-hypochlorite or peroxide-hexano-

dihidro-1,4-ftalazinediona) en medio alcalino, para producir el ión 3-aminoftalato excitado (**Figura 2**). Pueden utilizarse varios oxidantes, tales como el permanganato, hipoclorito o yodo, aunque el más usado es el peróxido de hidrógeno. La reacción es catalizada por iones metálicos (Fe(II), Cu(II), Co(II), entre otros), ferricianuro o algunos metalocomplejos (hemina, hemoglobina y peroxidasas). Esta reacción ha sido aplicada en la determinación de iones metálicos que actúan como catalizador, enzimas (peroxidasas, compuestos hemáticos, etc), ciertos oxidantes, inhibidores o sustancias que son fácilmente oxidables y que son determinadas indirectamente por la disminución de emisión quimioluminiscente. También el luminol se ha usado ampliamente en investigaciones criminales para detectar cantidades trazas de sangre, que no son visibles a simple vista, tales como restos de sangre seca incluso con varios años de antigüedad, en ropas lavadas, superficies intencionadamente limpiadas, superficies oscuras, etc. [2]. De hecho, la aplicación de un spray con luminol sobre la superficie a investigar puede producir una luminiscencia capaz de detectar hematina a dilución de  $1:10^8$ .

### 3.2. Imidazoles

La lofina (2,4,5-trifenilimidazol) es el precursor quimioluminiscente más representativo de estos

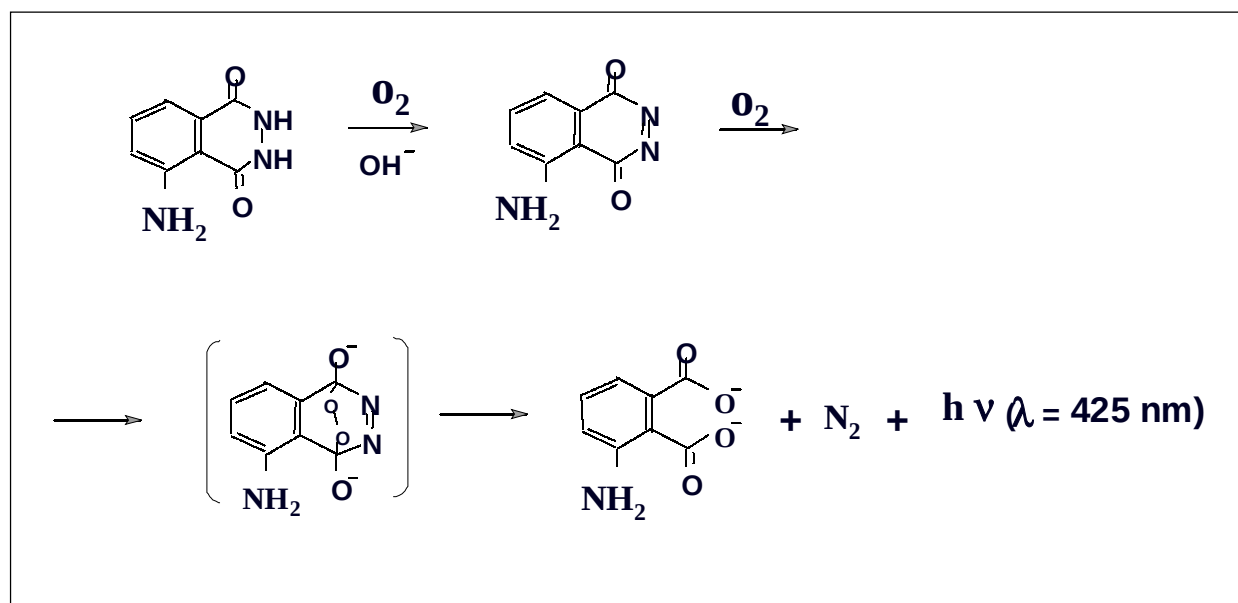
cyanoferrate (III) and  $O_2$ , in aqueous alkaline medium, to the hydroperoxide, from which excited state diaroylarylamidines are formed via a dioxetane structure that then emits light (**Figure 3**) [3]. Determination of Co(II), Cr(III), Cu(II),  $Fe(CN)_6^{3-}$ ,  $MnO_4^-$ ,  $ClO^-$ , amongst others have been carried out using this system. Recently, hydroxylammonium chloride was found to enhance the CL emission of the lophine-Co(II)- $H_2O_2$  system, allowing a very sensitive determination of Co(II) [4].

### 3.3. Acridinium esters

Lucigenin (10,10'-dimethyl-9,9'-biacridinium nitrate) is one of the more efficient CL substances which emits an intense green emission when oxidised in an alkaline medium [5]. Other acridinium derivatives have been shown to produce CL emission upon hydrogen peroxide oxidation of aqueous alkaline solutions. The main reaction product is N-methylacridone, acting as an active intermediate in the mechanism proposed by Rauhut *et al.* [6, 7] (**Figure 4**). Due to the reaction product being water-insoluble, the addition of a small amount of a surfactant, such as sodium dodecyl sulphate, prevents precipitation [8]. The application of this reaction has permitted the determination of several ions, oxidants or reducers, such as ascorbic acid [9].

FIGURA 2.- Mecanismo propuesto para la reacción del luminol.

FIGURE 2.- Proposed mechanism for the luminol CL reaction



compuestos. Cuando la lofina es oxidada, en medio básico, por peróxido-hipoclorito o peróxido-hexacianoferrato (III) y  $O_2$  a hidroperóxido, a partir del cual se forman diaróilarilamidinas en estado excitado a través de una estructura de dioxetano, que es la responsable de la emisión de la luz (**Figura 3**) [3]. Utilizando este sistema se ha llevado a cabo determinaciones de Co(II), Cr(III), Cu(II),  $Fe(CN)_6^{3-}$ ,  $MnO_4^-$ ,  $ClO^-$ , entre otros. Recientemente, se ha encontrado que el cloruro de hidroxilamonio aumenta la emisión quimioluminiscente del sistema lofina-Co(II)- $H_2O_2$ , permitiendo una determinación muy sensible de Co(II) [4].

### 3.3. Ésteres de acridinio

La lucigenina (nitrato de 10,10'-dimetil-9.9'-biacridinio) es uno de los compuestos quimioluminiscentes más eficientes, que emite una intensa luz verde cuando se oxida en medio básico [5]. Otros derivados del acridinio producen emisión quimioluminiscente al ser oxidados por peróxido de hidrógeno en disolución acuosa alcalina. El producto final de la reacción es la N-metilacridona, que actúa como intermediario activo en el mecanismo propuesto por Rauhut y col.[6, 7] (**Figura 4**). Debido a que este producto es insoluble en agua, la adición de pequeñas cantidades de un surfactante, tal como dodecilsulfato sódico puede utilizar para evitar la precipitación [8]. La aplicación de esta reacción ha permitido

### 3.4. Tris (2,2'-bipyridine) ruthenium (III)

Another CL system frequently applied involves the use of  $Ru(bpy)_3^{2+}$  which produces an orange emission at 610 nm from excited state  $[Ru(bpy)_3^{2+}]^*$  that can be obtained by different reactions which imply electron transfer and regeneration of the  $Ru(bpy)_3^{2+}$  species:

\* By reaction of  $Ru(bpy)_3^{3+}$  and  $Ru(bpy)_3^+$   
 $Ru(bpy)_3^{3+} + Ru(bpy)_3^+ \rightarrow [Ru(bpy)_3^{2+}]^* + Ru(bpy)_3^{2+}$

\* By reaction of  $Ru(bpy)_3^+$  with certain oxidants

$Ru(bpy)_3^+ + ox \rightarrow [Ru(bpy)_3^{2+}]^* + ox^-$

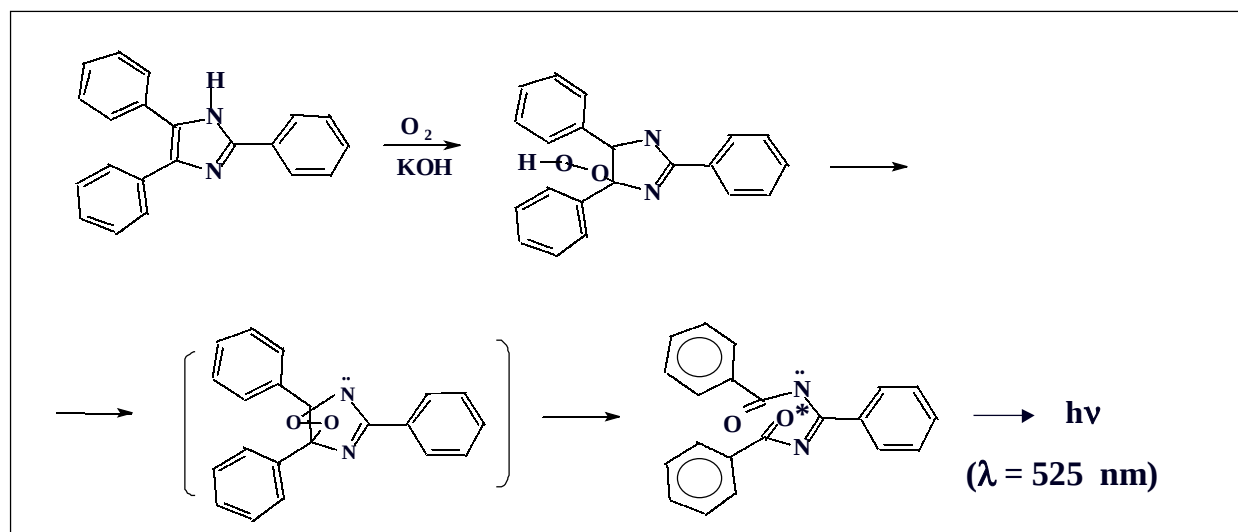
\* By reaction of  $Ru(bpy)_3^{3+}$  with certain reductants

$Ru(bpy)_3^{3+} + red \rightarrow [Ru(bpy)_3^{2+}]^* + red^+$

For these reactions the CL intensity is linearly proportional to the concentration of any of the reagents, allowing their determination by suitable adjustment of the remaining reagent concentrations. The solvent usually applied in CL determinations based on these reactions include acetonitrile-water, methanol-water and acetone-water [10]. Recently, the higher CL emission generated by a similar complex,  $Ru(phen)_3^{2+}$  (phen = 1,10-phenanthroline) during oxidation of  $Ru(phen)_3^{3+}$  by Ce(IV) in sulphuric acid medium was investigated, allowing the establishment of a CL method for the analysis of nucleic acids, which enhances the CL emission [11].

FIGURA 3.- Mecanismo propuesto para la reacción de la lofina.

FIGURE 3.- Proposed mechanism for the lophine CL reaction.



la determinación de varios iones, oxidantes o reductores como el ácido ascórbico [9].

### 3.4. Tris(2,2'-bipiridina) rutenio (III)

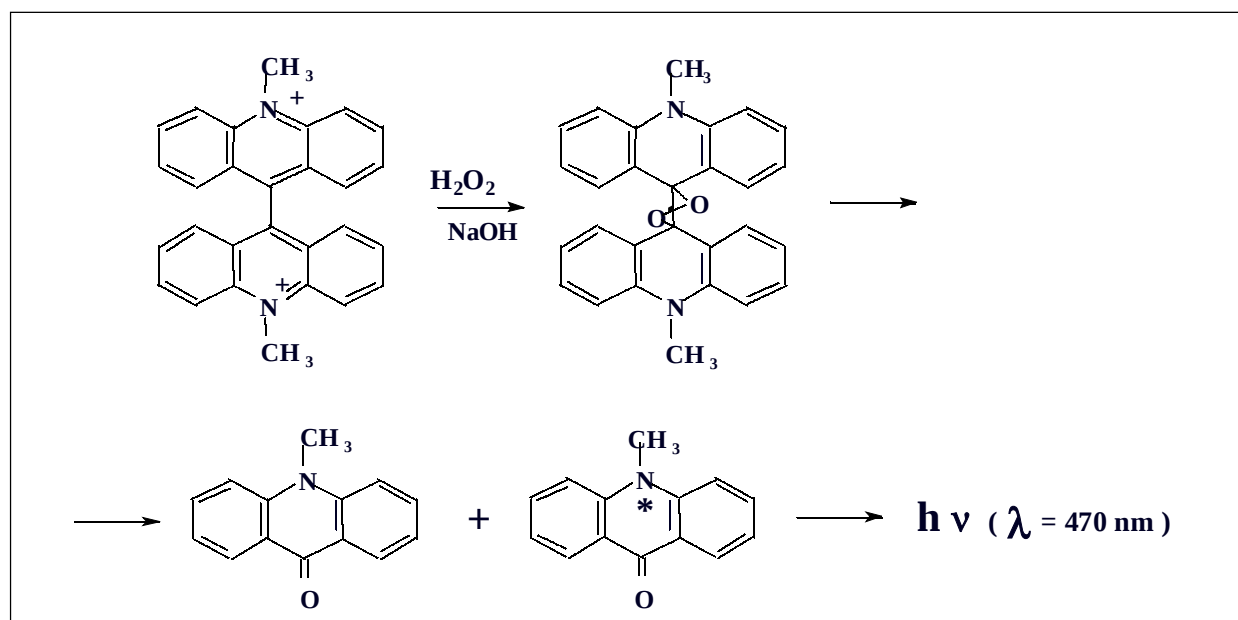
Otro sistema quimioluminiscente frecuentemente usado es el del complejo  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ , cuyo estado excitado  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}]^*$  produce una emisión naranja a 610 nm. El estado excitado puede conseguirse por diversas reacciones que implican la transferencia de un electrón y regeneración de la especie  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ :

### 3.5. Peroxyoxalates

In relation to indirect CL, one of the more efficient non-biological systems that are frequently used is based on the so-called peroxyoxalate CL reaction (PO-CL), which involves the hydrogen peroxide oxidation of an aryl oxalate ester in the presence of a fluorophore. The reaction is suggested to follow a CIEEL (chemically initiated electron exchange luminescence mechanism) via a high-energy intermediate, 1,2-dioxetanedione, which forms a charge complex with the fluoro-

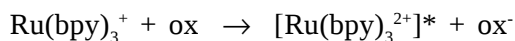
FIGURA 4.- Mecanismo propuesto para la reacción de la lucigenina.

FIGURE 4.- Proposed mechanism for the lucigenin CL reaction.

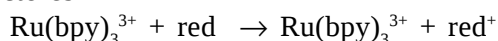


\* Por reacción de  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$  y  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^+$   
 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+} + \text{Ru}(\text{bpy})_3^+ \rightarrow [\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}]^*$

\*Por reacción de  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^+$  con ciertos oxidantes



\*Por reacción de  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$  con ciertos reductores



Para estas reacciones la intensidad de QL es linealmente proporcional a la concentración de cualquiera de los reactivos, lo que permite su determinación ajustando adecuadamente la concentración de los restantes reactivos que intervienen en ella. Los disolventes que se utilizan en las

phore, donating one electron to the intermediate [12]. This electron is transferred back to the fluorophore raising it to an excited state and liberating light characteristics typical for the fluorophore nature (**Figure 5**). Bis-(2,4,6-trichlorophenyl)oxalate (TCPO) and bis-(2,4-dinitrophenyl)oxalate (DNPO) are commonly used oxalates. The main disadvantage of this system resides in the insolubility of the above-mentioned compounds in water and their instability towards hydrolysis, which requires the use of organic solvents such as acetonitrile, dioxane, tert-butanol and ethyl acetate. This reaction can be used to determine a great number of species such as hydrogen peroxide, compounds that are highly fluorescent (e.g. polycyclic aromatic hydro-

determinaciones quimioluminiscentes basadas en estas reacciones suelen ser acetonitrilo-agua, metanol-agua y acetona-agua [10]. Recientemente, se ha investigado un complejo similar,  $\text{Ru}(\text{phen})_3^{2+}$  (phen= 1,10 fenantrolina), que genera una mayor emisión durante la oxidación de  $\text{Ru}(\text{phen})_3^{2+}$  por  $\text{Ce}(\text{IV})$  en medio ácido sulfúrico, permitiendo el establecimiento de un método quimioluminiscente para el análisis de ácidos nucleicos, con un gran aumento de la emisión de QL [11].

### 3.5. Peroxioxalatos

En QL indirecta, uno de los sistemas no biológicos más frecuentemente utilizados se basa en la reacción quimioluminiscente de los peroxioxalatos (PO-CL), que supone la oxidación por peróxido de hidrógeno de un éster aril oxalato en presencia de un fluoróforo. La reacción parece que sigue un mecanismo denominado “luminiscencia de intercambio electrónico iniciada químicamente” (CIEEL, chemically initiated electron exchange luminescence mechanism) a través de un intermediario de alta energía, la 1,2-dioxietanodiona, que forma un complejo de carga con el fluoróforo, donando un electrón al intermediario [12]. Este electrón es transferido al fluoróforo, que alcanza un estado excitado y al regresar al estado fundamental, produce una emisión característica propia de la naturaleza del fluoróforo (**Figura 5**). El bis-(2,4,6-triclorofenil) oxalato y el bis-(2,4-dinitrofenil) oxalato son los más corrientemente usados. La principal desventaja de este sistema reside en la insolubilidad de estos compuestos en agua y su inestabilidad por hidrólisis, por lo que se requiere el uso de disolventes orgánicos, tales como, acetonitrilo, dioxano, terbutanol y acetato de etilo. Esta reacción se aplica a la determinación de un gran número de compuestos como peróxido de hidrógeno, sustancias altamente fluorescente (ej. hidrocarburos aromáticos policíclicos) o compuestos que no siendo fluorescente pueden convertirse en fluorescentes, por reacción química con cloruro de dansilo (aminoácidos, esteroides, aminas alifáticas, ácidos carboxílicos, etc.) o con fluorescamina (catecolaminas) [13].

### 3.6. Reacciones bioluminiscentes

Los sistemas bioluminiscentes más utilizados desde el punto de vista analítico, son los basados

carbons) or compounds that do not exhibit native fluorescence but can be derivatized chemically using dansyl chloride (amino acids, steroids, aliphatic amines, carboxylic acids, etc.) or fluorescamine (catecholamines) [13].

### 3.6. Bioluminescent reactions

The analytically most widely applied BL systems are based on the firefly luciferin-luciferase reaction and the systems derived from the firefly *Photinus pyralis* and certain marine bacteria (*Vibrio harvey* and *Photobacterium fischeri*). Luciferases are stabilized by proteins such as albumin. In the former system, the hydrophobic enzyme luciferase catalyses the air oxidation of luciferin in the presence of ATP, which is consumed as a substrate to yield light emission at 562 nm [14]. The presence of  $\text{Mg}(\text{II})$  is necessary for the luciferase activity to be triggered. A detailed scheme is reported in **Figure 6**. Considering the stoichiometry of the reaction, for one ATP molecule consumed approximately one photon is emitted. This property, together with the high nucleoside specificity of the enzyme, makes this reaction an ideal analytical system for assaying ATP presence, ATP production or consumption in dependence of enzymatic activity, and for quantification of substrates linked to the ATP metabolism. ATP detection is an alternative to detect contamination from micro-organisms, food residues or human contact on surfaces. The advantage of ATP measurements in the evaluation of cleanliness lies in the ability to detect this product's residues and organic debris in addition to living micro-organisms. This system is being widely applied in the Quality Management and Assurance field to increase safety of foods [15] and in a wide range of fields such as environmental quality control [16], monitoring systems at sludge and sewage water plants [17], pharmaceutical and cosmetics industries [18, 19], vitality and quality of biomasses involved in fermentation processes [20], bacterial contamination in sterile areas (surgical rooms) or micro-organisms contribution to alterations affecting artistic works [21]. Several commercial kits are available and also directly usable on the field with portable instruments [22].

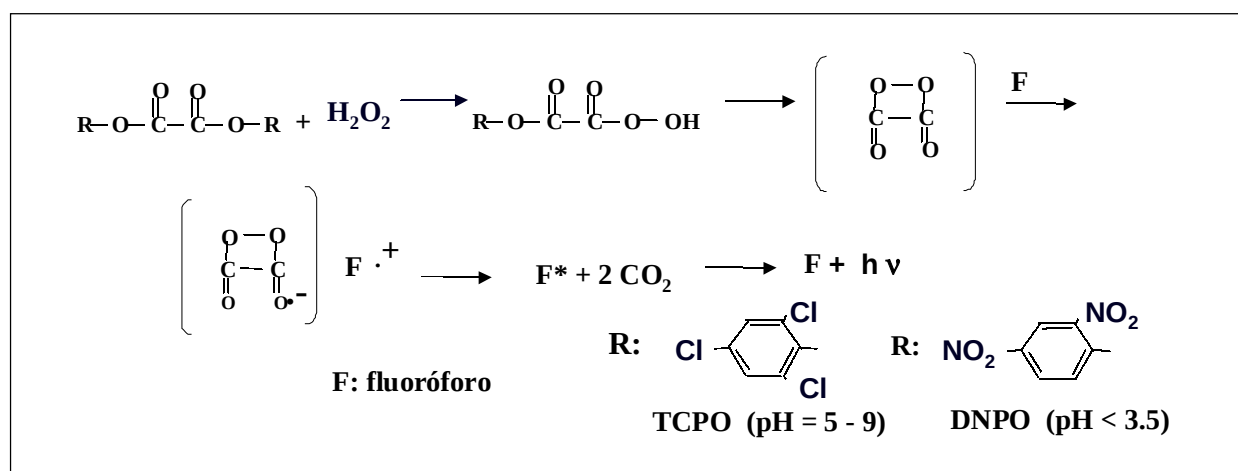
en la reacción luciferina-luciferasa y los sistemas derivados de la luciérnaga *Photinus pyralis* y ciertas bacterias marinas (*Vibrio harvey* y *Photobacterium fischeri*). Las luciferasas se estabilizan por proteínas como la albúmina. En el primer sistema, la enzima hidrofóbica luciferasa cataliza la oxidación por el aire de la luciferina en presencia de ATP, que se consume como sustrato para emitir luz a 562 nm [14]. Es necesaria la presencia de Mg(II) para que la lucife-

### 3.7. Direct oxidations

In the last years, there has been a development of new CL reactions by testing the analyte with a wide range of strong oxidants, such as  $\text{MnO}_4^-$  (in acidic and alkaline medium),  $\text{ClO}^-$ ,  $\text{Ce(IV)}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{IO}_4^-$ ,  $\text{Br}_2$ , N-bromosuccinimide, and reductants, under different ranges of chemical conditions [23]. Usually, if oxidation of the molecule is known to give a fluorescent product,

FIGURA 5.- Posible camino de reacción para el sistema de peroxioxalatos.

FIGURE 5.- Possible reaction pathway for the PO-CL system.



rasa muestre su actividad. Un detallado esquema se muestra en la **Figura 6**. Considerando la estequiometría de la reacción, por cada molécula de ATP consumida se emite aproximadamente un fotón. Esta propiedad, junto con la alta especificidad de la enzima por el nucleótido, hacen que esta reacción sea un sistema analítico ideal para detectar la presencia de ATP, su producción o consumo, que depende de la actividad enzimática y para cuantificar sustratos relacionados con el metabolismo del ATP. La detección de ATP es una alternativa para detectar la contaminación por microorganismos, residuos en alimentos o restos de contacto humano en superficies. Este sistema se emplea en el ámbito de la gestión y garantía de la calidad para aumentar la higiene de los alimentos [15] y en otros campos, tales como en control de calidad ambiental [16], en el seguimiento de plantas de lodos y aguas residuales [17], en la industria farmacéutica y de cosméticos [18, 19], en la calidad y vitalidad de la biomasa implicada en procesos de fermentación [20], en la contaminación bacteriana de

or if the analyte itself has a typical structure that might be fluorescent, there is a possibility that oxidation of the analyte will produce CL emission. Some of the first applications were the CL determination of morphine [24], buprenorphine hydrochloride [25] and the benzodiazepine lorazepam [26], using a flow injection analysis (FIA) assembly. In these cases, the sample containing the drug was injected into a phosphoric acid stream that was subsequently merged with the oxidant stream, offering an extremely simple, economic and effective experimental procedure. Since then, a wide range of such reactions have been reported mainly in the analysis of drugs [27]. Sensitizers, micellar media or catalysts can be added to these systems in order to enhance the CL emission. As example, penicillamine [28], tiopronin [29] and cefadroxil [30] have been determined in presence of quinine sulphate; folic acid [31], captopril [32], hydrochlorothiazide [33], phenothiazines [34] or furosemide [35] using rhodamines 6G or B and hydrazine in presence of dichlorofluoresceine [36]. Quinine sul-

áreas estériles o en el deterioro de obras artísticas por microorganismos[21]. Se han comercializados varios kits de reactivos, para usarlos directamente en el sistema adecuado mediante instrumentos portátiles con este fin [22].

### 3.7. Oxidaciones directas

En los últimos años, se han desarrollado nuevas reacciones quimioluminiscentes por reacción del analito en cuestión con oxidantes fuertes, tales como  $\text{MnO}_4^-$  (en medio ácido y alcalino),  $\text{ClO}^-$ ,  $\text{Ce(IV)}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{IO}_4^-$ ,  $\text{Br}_2$ , N-bromosuccinimida, y con reductores, en diferentes condiciones químicas [23]. Normalmente, si se conoce que la oxidación de la molécula da un producto fluorescente, o si el analito en si mismo, tiene una estructura que permita la emisión fluorescente, hay posibilidad de que la oxidación del mismo

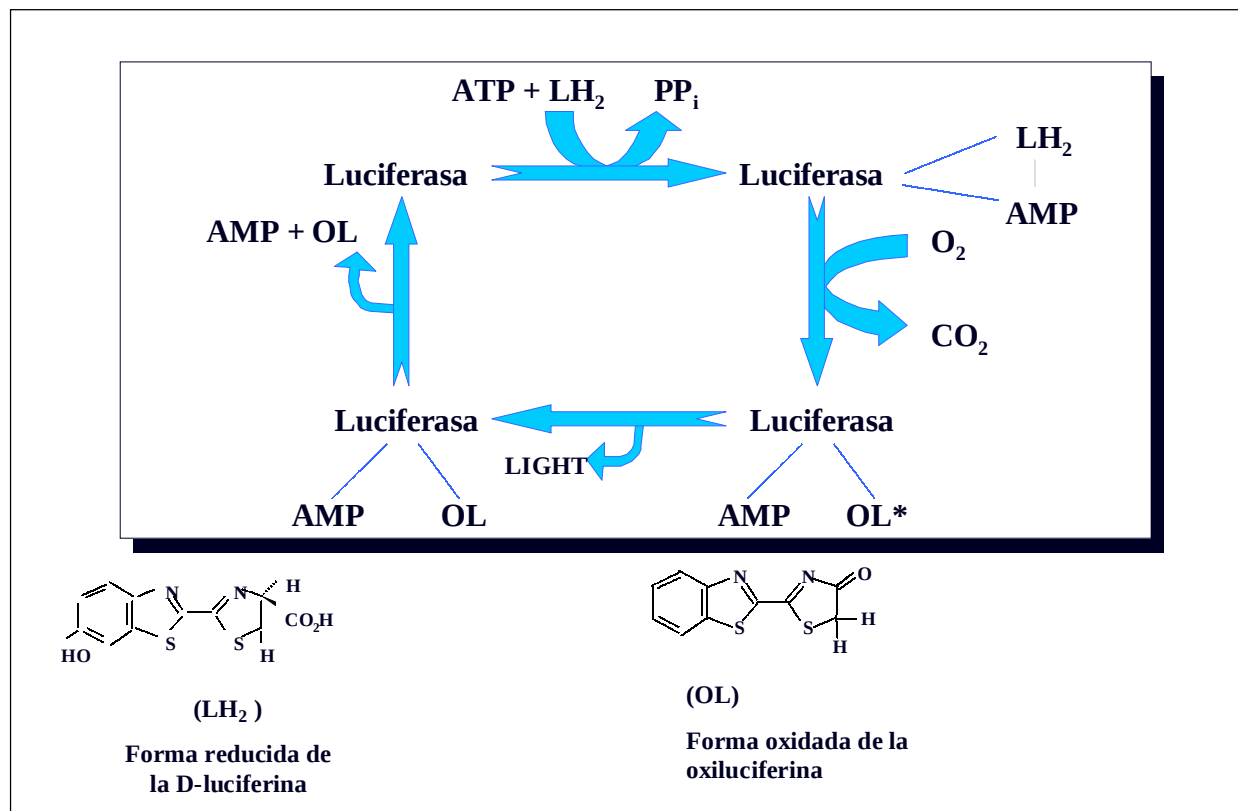
phate and Rhodamine 6G were simultaneously used for the determination of tiopronin [37]. Also, in the presence of the cationic surfactant cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB), tetracycline was determined with high sensitivity [38]. These reactions have been mainly applied to developed CL-based flow injection methods.

## BASIC INSTRUMENTATION

Measurement of light emitted from chemical or biochemical reactions is related to the concentration of participant species: the rate of light output is directly related to the amount of light emitted and, accordingly, proportional to the concentration of the specific specie. For this reason, the measurement of light is an indicator of the amount of analyte and the basic instru-

FIGURA 6.- Representación esquemática de la reacción de la luciferasa de luciérnaga. ATP, trifosfato de adenosina;  $\text{PP}_i$ , pirofosfato; AMP, monofosfato de adenosina.

FIGURE 6.- Schematic representation of the firefly luciferase reaction. ATP, adenosine triphosphate;  $\text{PP}_i$ , pyrophosphate; AMP, adenosine monophosphate.



produzca emisión de QL. Algunas de las aplicaciones de estos últimos sistemas han sido la determinación quimioluminiscente de morfina [24], hidrocloreuro de buprenorfina [25] y la benzodiazepina loprazolam [26] mediante análisis por inyección en flujo (FIA). En estos casos, la muestra conteniendo el fármaco se inyectaba en el canal por donde circula una disolución de ácido fosfórico que posteriormente se mezclaba con el oxidante, proporcionando un procedimiento sumamente simple, económico y efectivo. Desde entonces, un gran número de este tipo de reacciones han sido publicadas, principalmente en el análisis de fármacos [27]. Para aumentar la emisión de QL se han añadido a estos sistemas sensibilizadores, medios micelares o catalizadores. Como ejemplos podemos citar la determinación de penicilamina [28], tiopronina [29], cefadroxil [30] en presencia de sulfato de quinina; ácido fólico [31], captopril [32], hidrocloreotiazida [33], fenotiazinas [34] o furosemida [35] usando rodaminas 6G o B e hidracina en presencia de diclorofluoresceína [36]. El sulfato de quinina y la rodamina 6G se han utilizado conjuntamente para la determinación de tiopronina [37]. También, en presencia de un surfactante catiónico, bromuro de cetiltrimetil amonio (CTAB) se ha determinado tetraciclina con una alta sensibilidad [38]. Todas estas reacciones han sido aplicadas principalmente a métodos por inyección en flujo con detección quimioluminiscente.

## INSTRUMENTACIÓN BÁSICA

La medida de la luz emitida por una reacción química o bioquímica está relacionada con la concentración de las especies participantes: la producción total de luz está directamente relacionada con la cantidad de luz emitida y, consecuentemente, es proporcional a la concentración de la especie concreta. Por esta razón, la medida de luz emitida es un indicador de la cantidad de analito presente y al instrumento básico que es capaz de realizar estas medidas se le llama luminómetro. Una de las ventajas más importantes de la QL como técnica analítica es la simplicidad de la instrumentación, que incluye como componentes principales: una célula de reacción, un compartimento cerrado a la luz, un dispositivo de inyección y mezcla de reactivos y/o de muestra, un detector de luz y un sistema de ad-

mentation for these measurements is named a luminometer. One of the most important advantages of CL as analytical technique is the simplicity of this instrumentation, which includes as principal components: a reaction cell, a light-tight housing, a device for introducing and mixing the reagents and/or the sample, a light detector and an acquisition and signal processor system (Figure 7). In the housing a sample chamber holds the reaction cell (a test tube, a microplate, a flow-cell, etc.) in order to present the luminescing sample to the detector. This chamber must be sealed from ambient light to minimize potential interferences and it must be positioned as close to the detector as possible to maximize optical efficiency. Additional mirrors, lenses, and other devices can be used to increase the angle of collection and to obtain high optical efficiency which is desirable for an optimum signal-to-noise ratio, allowing rapid and precise measurements. The function of the housing is to maintain the mixture of sample and CL reagents at an adequate temperature and in the complete dark in order to isolate the external light from the detector. Usually no monochromator is required because the CL intensity arises from one species and other substances would hardly affect the spectral distribution of the light emitted.

In CL techniques, after mixing of the reagents and the sample, the CL reaction starts and the emission intensity is being produced, decreasing once the reactants are consumed. This implies a transient character of the CL emission, of which the time scale depends on the specific reaction, and which can range from a short flash to a continuous glow. This fact is crucial for the selection of the most convenient systems of reagent addition.

### 4.1. Introduction of sample and reagents

Depending on the configuration of the device and the method for sample and reagents introduction, it is possible to classify the systems into static (batch or discrete sampling instrument) or flowing streams.

In static systems, discrete portions of the CL reagent and the sample are mixed rapidly in the reaction cell, often at a controlled temperature. Usually the final reagent which initiates the CL reaction is added with a syringe or using an automatic injector in order to provide a more

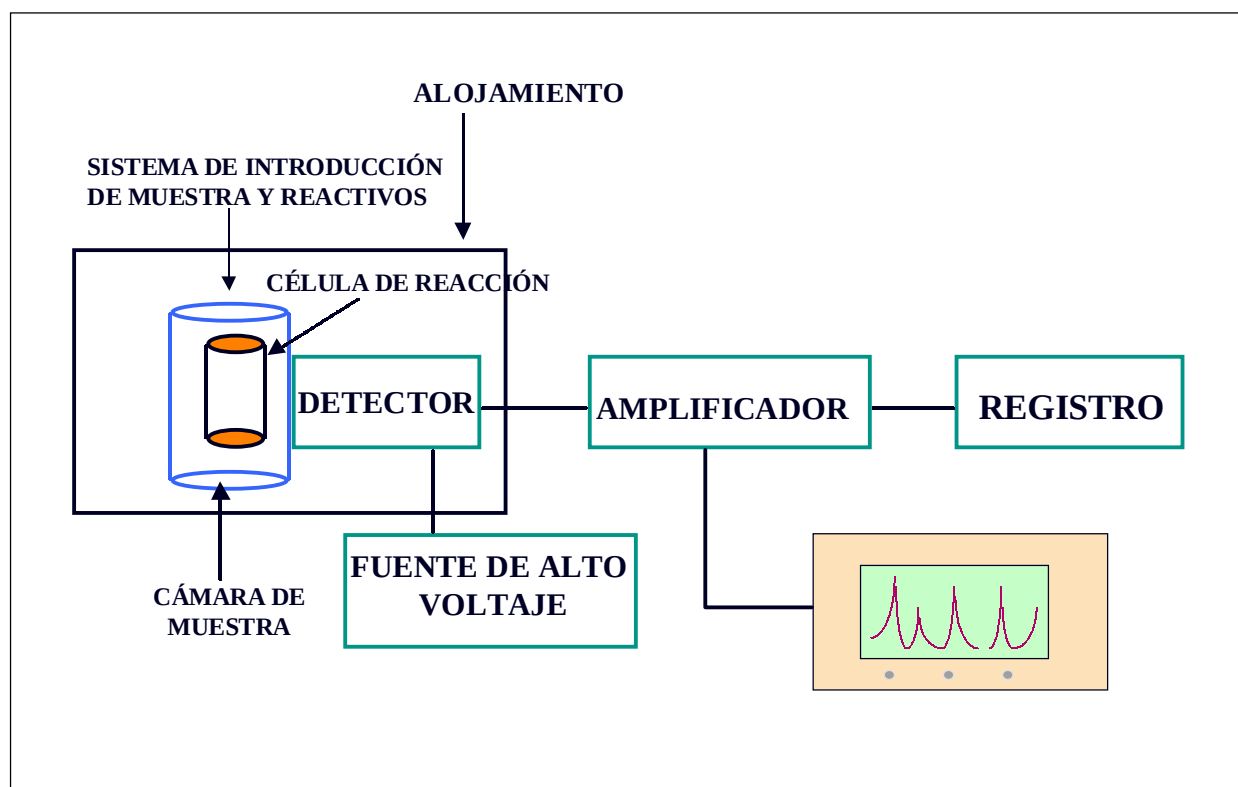
quisición y procesador de señal (**Figura 7**). En el compartimento cerrado se coloca la célula de reacción (un tubo de ensayo, un microplato, una célula de flujo, etc.) con objeto de que toda la luminiscencia sea captada por el detector. Este compartimento debe estar sellado a luz ambiental para evitar posibles interferencias y se debe colocar tan cerca como sea posible del detector para conseguir una máxima eficiencia óptica. Espejos, lentes y otros dispositivos adicionales se pueden utilizar para aumentar el ángulo de detección y conseguir una alta eficiencia óptica, al objeto de obtener una relación señal-ruido óptima; así, se obtiene un instrumento rápido y preciso. La función del compartimento es mantener la mezcla de reactivo y muestra, a una temperatura adecuada y en completa oscuridad a fin de aislar el detector de la luz externa. Normalmente no es necesario el uso de monocromadores porque la intensidad de QL que surge de una de las especies no se ve apenas afectada en su distribución espectral, por la presencia de otras especies.

reproducible injection speed and volume and a synchronization of data collection in relation to the initiation of the reaction. Mixing of sample and reagents is provided by the force of injection, although a magnetic stirring bar and stirrer can be used. In this case, the whole CL intensity vs. reaction time profile is monitored. Depending on the situation, the analytical signal can be taken as the maximum CL intensity (peak height), the signal after some fixed delay time from the point of mixing, the integral of the signal over some time period, or the integral of the entire peak (full area). All of these are correlated with the analyte concentration. This approach is used in selective reactions in solution phase showing high quantum yields or long time emission, such as bioluminescent reactions, CL immunoassay or nucleic acid assays.

Continuous flow CL systems are used in gas-phase and solution-phase reactions. The sample and the CL reagents are continuously pumped and mixed together using a merging zones flow-injection manifold and sent to a flow-cell or mixed

FIGURA 7.- Configuración esquemática de un luminómetro.

FIGURE 7.- Schematic configuration of a basic luminometer.



En las técnicas de QL, una vez mezclados los reactivos y la muestra comienza la reacción quimioluminiscente y la intensidad de la emisión que se está produciendo, disminuye una vez que los reactivos se han agotado. Esto supone que el carácter de la emisión quimioluminiscente es transitorio, y que la escala de tiempo depende de la reacción en cuestión, que va de un corto flash a una emisión continua. Este hecho es crucial para la selección del sistema más conveniente para la incorporación de los reactivos.

#### 4.1. Introducción de la muestra y los reactivos

Dependiendo de la configuración del dispositivo y del método de introducción de muestra y reactivos, los sistemas pueden clasificarse en: estáticos (introducción de cantidades discretas de reactivos y muestra en un recipiente) o sistemas en flujo.

En los sistemas estáticos, pequeñas porciones de muestra y reactivo CL se mezclan rápidamente en la cubeta de reacción, frecuentemente a temperatura controlada. Normalmente el reactivo final que inicia la reacción CL se adiciona con una jeringa o usando un inyector automático para conseguir una velocidad y volumen de inyección más reproducibles y una mejor sincronización de la adquisición de datos desde el inicio de la reacción. La mezcla de los reactivos y la muestra se produce por la fuerza de la inyección, aunque a veces, se puede utilizar un agitador magnético. En estos casos, se registra la curva completa de intensidad de emisión de QL en función del tiempo de reacción. Dependiendo de la situación, la señal analítica puede ser tomada como la intensidad máxima de QL (altura máxima del pico), la señal después de un tiempo fijado desde el momento de la mezcla, la integral de la señal en un determinado periodo tiempo o la integral del pico completo (el área completa). En cualquiera de los casos, las medidas estarán relacionadas de manera lineal con la concentración de analito. Esta técnica se usa en reacciones selectivas en disolución que muestran un alto rendimiento cuántico o un largo tiempo de emisión, como las reacciones bioluminiscentes, el inmunoensayo quimioluminiscente o ensayos de ácidos nucleicos.

Los sistemas de QL en flujo continuo se usan en reacciones en disolución y en fase gaseosa. La muestra y los reactivos son continuamente

and the emission observed in an integral reactor-flow cell. The signal is observed when the cell is totally filled with the reaction mixture, at a fixed period after mixing. In this case, it is possible to obtain a constant and reproducible signal, easier to measure, which represents the integrated output over the residence time of the reaction mixture in the cell. Optimum sensitivity is achieved by adjusting the flow rate, the observation cell volume and transfer channel volumes, with the aim of the observed portion of emission profile occurring at the maximum of the CL intensity vs. time profile. As disadvantages of this approach are to be mentioned the high reagent consumption, the fact that no kinetic information is obtained and that only a very small portion of the total CL intensity is measured for slow reactions.

In the flow injection mode, the analyte carrier stream and the reagent stream flow continuously; the sample containing the analyte is injected and the carrier transports it into the reaction and detection zone. The signal is acquired as a narrow peak, which corresponds to the portion of analyte passing through the cell. Depending of the situation, it is possible to inject not only the sample, but also other CL reagents, e.g., in the case of more expensive chemicals. This methodology shows as advantage the low consumption of analyte or CL reagents and the smaller volume of the cell, so as to prevent excessive dilution; the signal is highly reproducible and precise because it corresponds to the height of the peak; moreover it is possible -in given cases- to adapt on-line chemical treatments to improve selectivity (**Figure 8**).

#### 4.2. Reaction cell

Depending on the CL reaction that is carried out in the liquid, solid or gas phases it is possible to use different reaction cells, being the essential requirement for their design that the maximum intensity must be reached while the stream containing the analyte and the CL reagent is in front of the detector. It is a very critical variable because both in static and flow methods the magnitude of the CL intensity is proportional to the volume of the cell. Usually it is possible to apply any material that transmits light in the visible range and that is compatible with the sample, such as glass, quartz or even acrylic or other plastics. Polystyrene is not re-

bombeados y mezclados a través de un conector, en donde se produce la mezcla, que está muy próximo a la célula en donde se realiza la detección. La señal se observa cuando la célula está totalmente llena con la mezcla de reacción, a un tiempo predeterminado después de la mezcla. En estos casos, es posible obtener una señal constante y reproducible muy fácil de medir, y que representa la emisión total de la mezcla de reacción durante el tiempo que está en la célula. El óptimo de sensibilidad se consigue ajustando la velocidad de flujo y el volumen entre el punto de mezcla y el punto de observación con objeto de conseguir el perfil máximo de intensidad CL en función del tiempo. Como desventajas de esta técnica destacan el alto consumo de reactivo, el hecho de que no se obtenga ninguna información cinética y que solamente una pequeña porción de la intensidad de QL total es la que se mide cuando las reacciones son lentas.

En el modo de inyección de flujo, el analito se incorpora a una disolución portadora, el reactivo va por una línea aparte y fluye constantemente; la muestra es inyectada en la disolución portadora y a través de conectores o válvulas se mezcla con el reactivo, para producir la reacción de QL, muy cerca de la zona de detección. En estas condiciones, la señal se obtiene como un pico estrecho que se corresponde con la alícuota de analito inyectada. Dependiendo de la situación, es posible llevar a cabo, no sólo la inyección de muestra sino que también, en el caso de que los reactivos quimioluminiscentes sean caros, incorporarlos del mismo modo que la muestra, con objeto de evitar un consumo grande de los mismos. Esta metodología tiene la ventaja de un bajo consumo, tanto de muestra como de reactivos y la utilización de una célula de menor volumen, evitando así una dilución excesiva; la señal es muy reproducible y precisa ya que se puede conseguir que se corresponda con la máxima altura del pico; además, es posible - en algunos casos- incorporar tratamientos químicos "on line" para alcanzar una mayor selectividad (**Figura 8**).

#### 4.2. Célula de reacción

El tipo de célula de reacción va depender de que la reacción de QL se lleve a cabo en fase líquida, sólida o gaseosa, siendo un requerimiento esencial para su diseño que el máximo de intensidad se produzca cuando la mezcla anali-

commended because it can build up static electricity which may contribute to elevated background levels. More transparent cell materials allow more light to reach the detector, resulting in better detection limits.

In the case of flow CL measurements in the liquid phase, the cell design most frequently used is a long spiral cell (about 1 cm) which is located as close to the detector as possible. The large volume is required due to the need to collect a greater amount of emitted light and because the thin size required (50-100  $\mu\text{m}$ ) minimizes band broadening and provides a thin optical path to reduce inner filtering effects of the CL emission. With the purpose to minimize sample dispersion, usually the injection valve and the cell must be placed as close to one another as possible.

#### 4.3. Detector

There are four basic requirements for the detector, which constitutes the critical part of the luminometer [2]:

a) it must be able to detect a light signal over several orders of magnitude of intensity (from just a few photons per second to tens of millions of photons per second),

b) it must be sensitive at least over the spectral range 400-600 nm, and ideally over the complete range of the visible spectrum (i.e. 380-750 nm) and even into the UV and IR regions. If its sensitivity varies with wavelength, as is usually the case, then it must be possible to correct the data for this,

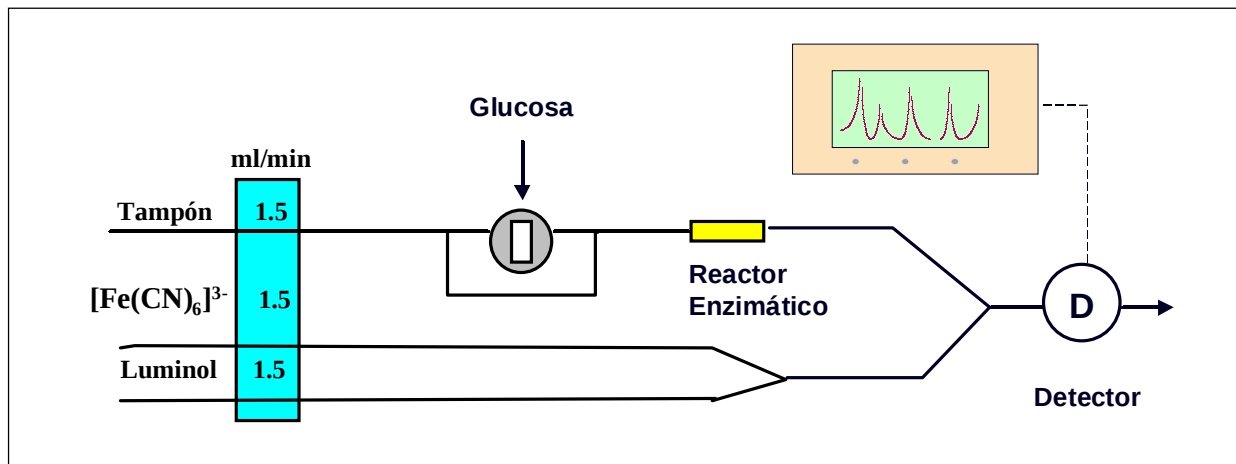
c) the signal output presented by the detector should be directly related to the light intensity reaching it, ideally linearly over the entire sensitivity range. The signal from the detector should be produced in a form which can be easily displayed, recorded, and analyzed,

d) the speed of response of the detector must be much faster than the rate of the CL reaction, if the signal output is not to be a distorted version of the true signal.

Light is detected by photosensitive devices through the generation of photocurrent. PMTs are the detection devices more frequently used in CL because of their high gains making them suitable for low light-level detection [39,40]. However, they must be operated with very stable power supplies to keep the total gain cons-

FIGURA 8.- Diagrama esquemático de un dispositivo FIA para el análisis de glucosa incorporando un reactor enzimático con detección basada en la reacción del luminol.

FIGURE 8.- Schematic diagram for an FIA manifold for the analysis of glucose incorporating an enzymatic reactor with detection based on the luminol reaction.



to-reactivo quimioluminiscente esté frente al detector. Es una variable muy crítica porque tanto en los métodos estáticos como los de flujos, la magnitud de la intensidad de QL es proporcional al volumen de la célula. Normalmente, es posible usar cualquier material que sea transparente a la luz en la región del visible y que sea compatible con la muestra, tales como vidrio, cuarzo, plástico acrílico u otros. El poliestireno no es aconsejable, porque adquiere con mucha facilidad electricidad estática y puede producir una señal alta de fondo. Las células construidas con los materiales más transparentes permiten la llegada de una mayor cantidad de luz al detector, consiguiéndose con ello unos mejores límites de detección.

En el caso de los métodos de inyección en flujo, el diseño más frecuente de la célula es en espiral (de aproximadamente 1 cm), colocándose lo más cerca posible del detector. Para minimizar el ensanchamiento de banda y reducir los efectos de filtro interno en la emisión de QL se necesita que la célula tenga un grosor pequeño (50-100  $\mu\text{m}$ ) y una superficie relativamente grande ya que la cantidad de luz emitida es directamente proporcional al volumen de la misma. Con objeto de reducir la dispersión de la muestra, generalmente la válvula de inyección y la célula se deben colocar tan cerca una de otra como sea posible.

tant. There are two different configurations for PMTs depending on their position in relation to the reaction cell: either to the side ("side-on" configuration) or underneath the reaction cell ("end-on" configuration). Side-on PMTs are usually more economical than end-on models and their vertical configuration takes up less space than the end-on versions. However, end-on PMTs have a large photocathode area and offer a greater uniformity of light collection and of the response [41].

Other detection modes in bright CL or BL reactions are multichannel detectors, which provide simultaneous detection of the dispersed radiation and produce a permanent image of a wide area. Photographic films or plates are emulsions that contain silver halide crystals in which incident photons produce stable clusters of silver atoms within the crystals. Internal amplification is provided in the development process by an electron donor which reduces the remaining silver ions to silver atoms within the exposed crystals. A complexing agent is used to remove the unexposed silver ions. The photographic detection is an integrating process in that the output (density of silver) is a result of the cumulative effect of the entire incident radiation during the exposing time. The image is constituted by many thousands of grains on each square cm of film, being neces-

### 4.3. Detector

Hay cuatro requerimientos básicos para el detector, que constituye la parte crítica del luminómetro [2] :

a) debe ser capaz de detectar una señal luminosa de varios órdenes de magnitud de intensidad (desde unos pocos fotones por segundo a decenas de millones por segundo),

b) debe ser sensible al menos en la región espectral de 400-600 nm, idealmente en la región completa del visible (380-750 nm) incluso en la regiones pertenecientes al UV e IR,

c) la señal registrada por el detector debe estar relacionada directamente con la intensidad de luz que ha llegado a él, idealmente directamente proporcional en todo el rango de sensibilidad requerido. La señal producida por el detector debe poder ser fácilmente leída, registrada y analizada,

d) la velocidad de respuesta del detector debe ser más rápida que la velocidad de la reacción de QL, si no, la señal será una versión distorsionada de la señal original.

La luz es detectada por dispositivos fotosensibles que generan una fotocorriente. Los fotomultiplicadores son los detectores más comúnmente utilizados en QL debido a su alta ganancia, que posibilita la detección de bajos niveles de luz [39,40]. Sin embargo, deben estar conectados a un estabilizador de corriente para poder mantener constante la ganancia total. Hay dos configuraciones posibles para los fotomultiplicadores dependiendo de su posición con respecto a la célula de reacción: en disposición lateral (configuración "side-on") o frontalmente a la célula de reacción (configuración "end-on"). Los fotomultiplicadores "side-on" suelen ser más baratos que los "end-on" y su configuración vertical hace que ocupen menos espacio que los últimos. Sin embargo, los "end-on" tienen un fotocátodo con mayor área y ofrecen una uniformidad superior en la detección y en la respuesta de la señal luminosa [41].

Otros modos de detección en reacciones que presentan QL o BL intensa son los detectores multicanales, que proporciona la detección simultánea de la radiación dispersada y produce una imagen permanente de un área amplia. Se usan películas o placas fotográficas que constan de emulsiones que contienen cristales de haluro de plata, de modo que cuando inciden fotones

sary only 10 to 100 photons to produce a developable grain. The main limitations are: non-linearity of the response over the wide range of light intensities required to observe CL, restricted dynamic range reciprocity failure and adjacent effects. More efficient imaging devices for CL are vidicon cameras and charged coupled devices (CCDs), which have been recently incorporated in CL instrumentation.

### 4.4. Signal conditioning, manipulation and readout

The photoanodic current from the PMT is first converted to voltage with an operational amplifier in the current-to-voltage configuration. Often, after further voltage amplification the readout signal from the analog transducers is converted to digital because of the digital domain allowing the signal to be treated with highly accurate digital methods or with software in a microcomputer. The increasing use of computer-controlled CL instruments allows the easy keyboard control of instrumental parameters, and the analytical response is stored in memory for later manipulation. Even specific software has been designed for specialized applications such as kinetics studies and measurements, flow systems CL studies, CL detectors coupled to HPLC or GC, etc.

## MAIN CHEMILUMINESCENCE APPLICATIONS

In the last few years, analytical interest in the use of CL systems in analytical (including pharmaceutical analytical) chemistry is growing exponentially, mainly in gas and liquid-phases; however, CL applications in the solid phase are more limited. Table 2 shows some of the applications of the more widely used CL systems.

sobre ellas se produce una cascada estable de átomos de plata en el interior del cristal. La amplificación interna en el desarrollo del proceso se consigue a través de un donador de electrones, que reduce los iones de plata restantes a átomos de plata dentro de los cristales que han estado expuesto a la emisión. Suele utilizarse un agente complejante utilizar para eliminar los iones plata que no han reaccionado. La detección fotográfica es un proceso integrante en el que la señal de salida (densidad de plata en la película) es el resultado del efecto acumulativo de la radiación incidente total durante el tiempo de exposición. La imagen está constituida por muchos miles de granos de plata por cada  $\text{cm}^2$  de película, siendo necesario solamente de 10 a 100 fotones para producir el desarrollo de los granos de plata. Las principales limitaciones son: la no linealidad de las respuestas en un amplio rango de intensidades de luz necesarias para observar la emisión de QL, rango dinámico limitado por fallo de reciprocidad y efectos adyacentes. Otros dispositivos más eficientes para la obtención de imágenes en QL son las cámaras vidicon y los dispositivos de carga acoplada (CCDs, charged coupled devices), que recientemente han sido incorporados a la instrumentación en QL.

#### *4.4. Acondicionamiento de la señal, manipulación y lectura*

La corriente fotoanódica procedente del fotomultiplicador es convertida en primer lugar en voltaje con un amplificador operacional en la configuración corriente-a-voltaje. A menudo, después de la amplificación del voltaje, la señal de salida de los transductores analógicos se convierte a digital, porque en modo digital es posible tratar la señal con métodos digitales muy exactos o con un programa en un microordenador. El uso de ordenadores que controlan los instrumentos en QL, hace posible el control de los parámetros instrumentales de forma fácil, a través del teclado del ordenador y el almacenamiento de la respuesta analítica en la memoria del mismo para una posterior manipulación. Actualmente existen algunos programas diseñados para aplicaciones específicas, tales como medidas y estudios cinéticos, estudio de sistemas quimioluminiscentes en flujo, para detectores quimioluminiscentes acoplados a cromatografía líquida o de gases, etc.

TABLA II. Algunas aplicaciones de los principales sistemas de QL.

TABLA II. Common applications of the main CL systems.

| Fase    | Reactivo                                                                                                             | Analito                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|---------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Gas     | Etileno                                                                                                              | O <sub>3</sub>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| Gas     | O <sub>3</sub>                                                                                                       | Hidrocarburos<br>NO                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| Gas     | O <sub>3</sub> después de conversión del analito a NO                                                                | Nitrosaminas<br>Nitrógeno total                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| Gas     | Llama H <sub>2</sub>                                                                                                 | Compuestos azufrados                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| Gas     | Llama H <sub>2</sub> seguida por O <sub>3</sub>                                                                      | Compuestos azufrados                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| Líquida | Luminol y derivados                                                                                                  | Iones metálicos y complejos (Co(II), Cu(II), Fe(III), Zn(II), Cd(II), Mn(II), Cr(III), Cr(IV), Pt(IV), ClO <sup>-</sup> , Fe(CN) <sub>6</sub> <sup>3-</sup> )<br>Compuestos Hemáticos<br>Peroxidasas<br>Oxidantes (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , O <sub>2</sub> , I <sub>2</sub> , etc.)<br><b>Inhibidores (Ag(I), Ce(IV), Ti(IV), V(V), etc.)</b><br><b>Sustancias fácilmente oxidables e indirectamente determinadas (ácido ascórbico, ácido carboxílico, aminas, etc.)</b><br>Sustancias convertidas en H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (glucosa, etc.)<br>Sustancias marcadas con luminol y derivados |
| Líquida | Acridinium esters                                                                                                    | Sustancias marcadas con esters de acridinio<br>Iones (Ag(I), Bi(II), Ce(II), Co(II), Cr(III), Cu(II), Fe(III), Mn(II), etc.)<br>Oxidantes (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , O <sub>2</sub> , etc.)<br>Sustancias convertidas en H <sub>2</sub> O <sub>2</sub><br>Compuestos reductores (Cr(II), Fe(II), Mo(V), ácido ascórbico, tetraciclinas, azúcares, etc.)                                                                                                                                                                                                                                             |
| Líquida | Ru(bpy) <sub>3</sub> <sup>3+</sup>                                                                                   | Aminas alifáticas                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| Líquida | Peroxioxalatos                                                                                                       | Oxidantes (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , etc.)<br>Fluoróforos (hidrocarburos aromáticos policíclicos, etc.)<br>Compuestos marcados con fluoróforos (aminoácidos, esteroides, aminas alifáticas, ácidos carboxílicos, catecolaminas, etc.)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| Líquida | Oxidación directa con MnO <sub>4</sub> <sup>-</sup> , ClO <sup>-</sup> , Ce(IV), IO <sub>4</sub> <sup>-</sup> , etc. | Diferentes moléculas (usualmente en aplicaciones farmacéuticas)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| Sólida  | O <sub>2</sub> y calor                                                                                               | Polímeros                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |

## PRINCIPALES APLICACIONES QUIMIOLUMINISCENTES

En los últimos años, el interés en el uso de sistemas quimioluminiscentes en química analítica (incluyendo el campo del análisis farmacéutico) está creciendo exponencialmente, principalmente en fase líquida y gaseosa; sin embargo, las aplicaciones en fase sólida son más limitadas. En la **Tabla 2** se recogen algunas aplicaciones de los sistemas quimioluminiscentes más frecuentemente utilizados.

## BIBLIOGRAFÍA/REFERENCES

- 1 Campbell. *Chemiluminescence. Principles and Applications in Biology and Medicine*. Chichester: Ellis Horwood/VCH, 1988.
- 2 Culliford B.J. *The Examination and Typing of Bloodstains in the Crime Laboratory*; US Gov't Printing Office: Washinton DC, 1971.
- 3 White, E.H., Harding, M.J.C. *Photochem Photobiol* **1965**; 4: 1129-1134.
- 4 Nakashima, K., Yamasaki, R.; Shimoda, R.; Kuroda, N.; Akiyama, S.; Baeyens, W.R.G. *Biomed Chromat* **1997**; 11: 63-64.
- 5 Gleu K.; Petsch, W. *Angew Chem* **1935**; 48: 57-59.
- 6 Rauhut M.M., Sheehan D., Clarke R.A., Semsel A.M. *Photochem Photobiol* **1965**; 4: 1097-1110.
- 7 Rauhut M.M., Sheehan D., Clarke R.A., Roberts B.G., Semsel A.M. *J Org Chem* **1965**; 30: 3587-3592.
- 8 Klopff, L.L.; Nieman, T.A. *Anal Chem* **1984**; 56: 1539-1542.
- 9 Kawashima, T., Hasebe, T. *Anal Sci* **1996**; 12: 773-777.
- 10 Lee, W.Y., Nieman, T.A. *Anal Chim Acta* **1996**; 334: 183-191.
- 11 Han, H.Y., He, Z.K., Zeng, Y.E. *Fresenius J Anal Chem* **1999**; 364: 782-785.
- 12 Schuster G.B. *Acc Chem Res* **1979**; 12: 366-373.
- 13 Kuroda, N., Nakashima, K. In *Modern Derivatization Methods for Separation Sciences*; Toyo'oka, T., Ed.; Wiley: New York, 1999, Chapter 4.
- 14 DeLuca M.A., McElroy W.D. *Methods Enzymol* **1978**; 57:1-124.
- 15 Poulis J.A., de Pijper M. *Int J Food Microbiol* **1993**; 20:109-116.
- 16 Tuovila B.J., Dobbs F.C., LaRock P.A., Siegel B. *Appl Environ Microbiol* **1987**; 53: 2749-2753.
- 17 Arretxe, M., Heap, J. M., Christofi, N. *Int Environ Toxicol Water Qual* **1997**; 12:23-29.
- 18 Hoffer, S., Jimenez-Misas, C., Lundin, A. *Luminescence* **1999**; 14:255-261.
- 19 Nielsen, P., Van Dellen, E. *J AOAC Int* **1989**; 72: 708-711.
- 20 Storgårds E., Juvonen R., Vanne L., Haikara A.. *Detection methods in process and hygiene control. European Brewery Convention, Monograph 26-Symposium Quality Issues & HACCP*, Stockholm, Sweden, **1997**, pp 95-107.
- 21 Sorlini, C., Cesarotti, E. *Ann Microbiol* **1991**; 41: 267-276.
- 22 Andreotti, P.E., Berthold, F. *Luminescence* **1999**; 14: 19-22.
- 23 Abbott, R.W., Townshend A. *Anal Proc* **1986**; 23: 25-26.
- 24 Abbott, R.W., Townshend, A., Gill, R. *Analyst* **1986**; 111: 635-640.
- 25 Alwarthan, A.A., Townshend, A. *Anal Chim Acta* **1986**; 185: 329-353.
- 26 Andrews, A.R.J., Townshend A. *Anal Chim Acta* **1989**; 26: 368-369.
- 27 Calokerinos, A.C., Deftereos, N.T., Baeyens, W.R.G. *J Pharm Biomed Anal* **1995**; 13, 1063-1071.
- 28 Zhang, Z.D., Baeyens, W.R.G., Zhang, X.R., Van der Weken, G. *Analyst* **1996**; 121, 1569-1572.
- 29 Zhao, Y.N., Baeyens, W.R.G., Zhang, X.R., Calokerinos, A.C., Nakashima, K., Van der Weken, G. *Analyst* **1997**; 122: 103-106.
- 30 Aly, F.A., Alarfaffj, N.A., Alwarthan, A.A. *Talanta* **1998**; 47: 471-478.

- 31 Alwarthan, A.A. *Anal Sci* **1994**; 10: 919-922.
- 32 Zhang, Z.D., Baeyens, W.R.G., Zhang, X.R., Van der Weken, G. *J Pharm Biomed Anal* **1996**; 14: 939-945.
- 33 Ouyang, J., Baeyens, W.R.G., Delanghe, J., Van der Weken, G., Calokerinos, A.C. *Talanta* **1998**; 46, 961-968.
- 34 Aly, F.A., Alarfaj, N.A., Alwarthan, A.A. *Anal Chim Acta* **1998**; 358: 255-262.
- 35 Rao, Y., Zhang, X.R., Luo, G., Baeyens, W.R.G. *Anal Chim Acta* **1999**; 396: 273-277.
- 36 Safavi, A., Baezzat, M.R. *Anal Chim Acta* **1998**; 358, 121-125.
- 37 Pérez Ruiz, T.; Martínez Lozano, J.; Baeyens, W.R.G., Sanz, A., San Miguel, M.T. *J Pharm Biomed Anal* **1998**; 17: 823-828.
- 38 Li, Z., Wang, Z.B. *Xiamen Dauxue Xuebao* **1997**; 36: 804-807.
- 39 Ingle, J.D. Jr, Crouch, S.R. *Spectrochemical Analysis*. New Jersey: Prentice Hall, 1988. pp. 106-117.
- 40 Turner, G.K. In: Van Dyke, K., Ed. *Bioluminescence and Chemiluminescence: Instruments and Applications*. Vol. I. Boca Raton, FL: CRC Press, 1985, pp. 43-78.
- 41 Drozdowicz, Z.B., Ed. *The Book of Photon Tools*. Oriel Instruments, USA. pp. 6-7; 6-65.